

M^a Paz Peris Peris

Estudio de la inmunopatogenia producida
por *Leishmania infantum* en el aparato
reproductor masculino y músculo temporal
en modelo canino. Valoración de la proteína
NGAL como nuevo biomarcador precoz de
daño renal e inflamación

Departamento
Patología Animal

Director/es

Castillo Hernández, Juan Antonio
Moreno Burgos, Bernardino

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

ESTUDIO DE LA INMUNOPATOGENIA PRODUCIDA POR
LEISHMANIA INFANTUM EN EL APARATO REPRODUCTOR
MASCULINO Y MÚSCULO TEMPORAL EN MODELO CANINO.
VALORACION DE LA PROTEÍNA NGAL COMO NUEVO
BIOMARCADOR PRECOZ DE DAÑO RENAL E INFLAMACIÓN

Autor

M^a Paz Peris Peris

Director/es

Castillo Hernández, Juan Antonio
Moreno Burgos, Bernardino

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Patología Animal

2017



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

Estudio de la inmunopatogenia producida por *Leishmania infantum* en el aparato reproductor masculino y músculo temporal en modelo canino.

Valoración de la proteína NGAL como nuevo biomarcador precoz de daño renal e inflamación.

Memoria presentada por

María Paz Peris Peris

Para optar al grado de Doctor en Veterinaria

Dirigida por los Doctores

D. Juan Antonio Castillo Hernández y

D. Bernardino Moreno Burgos

Zaragoza, Octubre 2017



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza

D. Juan Antonio Castillo Hernández, Catedrático de Universidad del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza,

D. Bernardino Moreno Burgos, Ayudante Doctor del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada “Estudio de la inmunopatogenia producida por *Leishmania infantum* en el aparato reproductor masculino y músculo temporal en modelo canino. Valoración de la proteína NGAL como nuevo biomarcador precoz de daño renal e inflamación “, presentada por la Licenciada en Veterinaria D^a. María Paz Peris Peris, ha sido realizada bajo su dirección, cumpliendo los requisitos exigidos en la legislación vigente y ajustándose al plan de Investigación de Tesis Doctoral inicialmente presentado para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Zaragoza, octubre de 2017

Juan Antonio Castillo Hernández

Doctor en Veterinaria

Bernardino Moreno Burgos

Doctor en Veterinaria

A las tres mujeres de mi vida:

*A Rosa, mi madre, M^aLuz, mi tía y
a Felisa, mi otra madre.*

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que me han ayudado y han hecho posible que este trabajo, tras cuatros años de investigación y estudio, puede ser presentado al mundo científico. A todas ellas quiero manifestar mi agradecimiento.

En primer lugar, a Juan Antonio Castillo, que me dio la oportunidad de formar parte de su equipo recién acabada mi Licenciatura en Veterinaria. Todo ste tiempo de trabajo a su lado ha sido un aprendizaje continuo. Nunca me han dejado de sorprender sus conocimientos en Parasitología, en especial los referentes a la Leishmaniosis canina. Ojalá algún día llegue a estar a su altura.

En segundo lugar, y no por ello menos importante, a Bernardino Moreno que me abrió las puertas de anatomía patológica y me enseñó a resolver la infinidad de dudas que me han surgido a lo largo de este trabajo.

Muchísimas gracias a los dos por todo lo que he aprendido con ellos.

A Alberto Cortés, por la confianza que depositastó en mí y que ha sido la herramienta que me ha dirigido al mundo de la investigación. Gracias por iniciar todo esto y por seguir a mi lado siempre que lo he necesitado.

A Mariano Morales, por estar siempre disponible para resolver mis dudas en el mundo del análisis de laboratorio en el que tantas veces me he sentido perdida. Como bien dice, "lleva el diagnóstico en la sangre".

A Javier Lucientes, porque a su lado he aprendido nuevo cada día en el mundo de la entomología, por su acarterístico buen humos y por su apoyo constante.

A Juan José Badiola por abrirme las puertas del centro de encefalopatías donde me he sentido una más en su equipo. Gracias por su cercanía y generosidad.

A Manolo Gascón y Pablo Gómez, gracias sus vuestras palaras de ánimo y la positividad que transmiten constantemente. Trabajar con ellos siempre es un placer.

Al centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, concretamente a Vicente Larraga del que siempre he recibido palabras de cariño, por su inestimable colaboración en este proyecto.

Al equipo de CZ Veterinaria, con Esteban Rodríguez y Eugenia Puentes al frente. Gracias a todos ellos por la confianza y el apoyo que me han trasmitido sin los cuales esta tesis no hubiera sido posible.

Agradecimientos

Y, para terminar mi agradecimiento también a M^a Jesús Gracia, a Rosa Estrada y a Miguel Angel Peribañez, por hacerme sentir una compañera más y con los que he pasado momentos muy entrañables.

Gracias a todos. Gracias. Gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	17
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	7
2.2. ETIOLOGÍA	7
2.2.1. EL PARÁSITO	7
2.2.2 EL VECTOR.....	12
2.2.3 CICLO BIOLÓGICO.....	15
2.3 EPIDEMIOLOGÍA	17
2.3.1 IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LA LEISHMANIOSIS A NIVEL MUNDIAL	17
2.3.2 IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LA LEISHMANIOSIS CANINA.....	19
2.3.3 VIAS DE TRANSMISIÓN DE LA LEISHMANIOSIS CANINA	20
2.3.4 MODELOS EXPERIMENTALES	21
2.4 INMUNOLOGÍA, PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS.....	23
2.4.1 RESPUESTA INMUNITARIA: INNATA Y ADQUIRIDA.....	24
2.4.2 PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS	29
2.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	33
2.5.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO	34
2.5.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	35
2.5.3 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO	36
2.5.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	38
2.5.5 DETECCIÓN DE RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR	40
3. MATERIAL Y MÉTODOS	41
3.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS	43
3.2 METODOLOGÍA GENERAL.....	44
3.2.1 ANIMALES.....	44
3.2.2 INFECCIÓN EXPERIMENTAL.....	45
3.2.3 EXAMEN CLÍNICO	46
3.2.4 EUTANASIA DE LOS ANIMALES Y RECOGIDA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	47
3.2.5 TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS	48
3.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL TEJIDO MUSCULAR Y REPRODUCTOR MASCULINO	55
3.3.1 ANIMALES.....	55
3.3.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	55
3.3.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	56
3.3.4 ESTUDIO MOLECULAR.....	58
3.4 ESTUDIO DE NGAL COMO BIOMARCADOR DE DAÑO RENAL CRÓNICO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR LEISHMANIA INFANTUM	59
3.4.1 ANIMALES.....	59

3.4.2 MUESTRAS	59
3.4.3 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS.....	60
3.4.4 ESTUDIO HISTOLÓGICO	62
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	62
4. RESULTADOS	65
4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN Y ELECCIÓN DE LA PRUEBA SEROLÓGICA	67
4.1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN.....	67
4.1.2. ELECCIÓN DE LA TÉCNICA SEROLÓGICA ÓPTIMA	69
4.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO EN MÚSCULO TEMPORAL	74
4.2.1. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	74
4.2.2 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	79
4.2.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y MOLECULAR DEL PARÁSITO Y DE SU ASOCIACIÓN CON LAS LESIONES	85
4.3 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO EN TESTÍCULO	88
4.3.1. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	88
4.3.2 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	90
4.3.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y MOLECULAR DEL PARÁSITO Y DE SU ASOCIACIÓN CON LAS LESIONES	95
4.4. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO EN EPIDÍDIMO.....	97
4.4.1. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	97
4.4.2 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	98
4.4.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRESENCIA DEL PARÁSITO EN LA LESIÓN	104
4.5 ESTUDIO DE NGAL COMO BIOMARCADOR DE DAÑO RENAL CRÓNICO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR LEISHMANIA INFANTUM.....	106
4.5.1 ESTUDIO BIOQUÍMICO.....	106
4.5.2 ESTUDIO HISTOLÓGICO	108
4.5.3. ANÁLISIS COMPARATIVO PARA LA EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA NGAL EN BASE A LOS HALLAZGOS HISTOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS	110
4.5.4 RELACIÓN ENTRE LA INFLAMACIÓN DE TEJIDO MUSCULAR Y REPRODUCTOR MASCULINO CON EL DAÑO RENAL DETECTADO MEDIANTE HISTOLOGÍA.....	114
4.5.5 RELACIÓN ENTRE LA INFLAMACION EN TEJIDO MUSCULAR Y RESPRODUCTOR MASCULINO CON LA DETECCIÓN DE NGAL EN ORINA	115
5. DISCUSIÓN	117
5.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN Y ELECCIÓN DE LA PRUEBA SEROLÓGICA	119
5.1.1 ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS	119
5.1.2 ESTUDIO SEROLÓGICO.....	120

5.1.3 ESTUDIO PARASITOLÓGICO	121
5.1.4 ELECCIÓN PRUEBA SEROLÓGICA.....	122
5.1.5 INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE LA CLÍNICA, SEROLOGÍA Y qPCR.....	124
5.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO EN MÚSCULO TEMPORAL.....	124
5.2.1 PAPEL DEL PARÁSITO	126
5.2.2 PAPEL DEL SISTEMA INMUNE	128
5.3 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO EN TESTÍCULO Y EPIDÍDIMO	132
5.3.1. PAPEL DEL PARÁSITO	134
5.3.2 PAPEL DEL SISTEMA INMUNE	136
5.4 ESTUDIO DE NGAL COMO BIOMARCADOR DE DAÑO RENAL CRÓNICO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR LEISHMANIA INFANTUM	139
5.4.1 PROTEINURIA.....	139
5.4.2 HISTOLOGÍA	141
5.4.3 RELACIÓN OTROS TEJIDOS.....	143
6. CONCLUSIONES.....	145
7. RESUMEN.....	149
8. BIBLIOGRAFÍA	153
9. ANEXOS	167
10. ÍNDICE DE TABLAS.....	185
11. ÍNDICE DE FIGURAS	191
12. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	197

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La Leishmaniosis visceral canina (Lcan) es una enfermedad grave que afecta a una amplia variedad de animales domésticos y salvajes y también a la especie humana. Está ampliamente distribuida por la cuenca Mediterránea y el continente americano, que la causa el protozoo *Leishmania infantum*.

El cuadro clínico y lesional es variable y está condicionado por la capacidad del protozoo para multiplicarse en células del sistema fagocítico mononuclear y su habilidad para evadir la respuesta inmunitaria. En este sentido la respuesta inmune del hospedador juega un papel crucial en la evolución de la infección. Clásicamente, se observan lesiones en la piel y diversos órganos, especialmente los del sistema linfoide, que se caracterizan por la presencia de una inflamación de tipo linfoplasmocitario y granulomatoso.

El desarrollo de los signos clínicos y las lesiones en perros con leishmaniosis se pueden producir por dos mecanismos patogénicos: en primer lugar, por una inflamación en los lugares donde se multiplica el parásito que se caracteriza por la presencia de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, llegando a formar frecuentemente granulomas parasitarios. Este mecanismo da lugar a manifestaciones clínicas en piel, hígado, intestino y mucosas. En segundo lugar, las lesiones pueden ser debidas al depósito de inmunocomplejos (principalmente inmunoglobulinas de tipo G y M). En este sentido se han descrito dos reacciones de hipersensibilidad. La hipersensibilidad de tipo II que se produce debido a reacciones mediadas por la interacción de un anticuerpo con el antígeno presente en la superficie de las células y otros componentes tisulares, tanto en forma de citotoxicidad mediante células dependientes de anticuerpo como por reacciones dependientes del complemento. Por otra parte, la hipersensibilidad de tipo III que se asocia con el depósito de inmunocomplejos circulantes en los tejidos provocando activación de células fagocitarias y daño tisular. Debido a este mecanismo aparecen lesiones renales, oculares, articulares y vasculares, que se traducen en signos de uveítis, poliartritis, vasculitis y enfermedad renal. Todos estos signos son de peor pronóstico que los producidos por granulomas inflamatorios.

Sin embargo, existen otros tejidos que también sufren lesiones, cuyos mecanismos patogénicos, en la actualidad, no están definidos en profundidad. Este es el caso del músculo temporal, el cual presenta habitualmente atrofia muscular. Y, por otro lado, el aparato reproductor masculino, de vital importancia en la implicación de la posible transmisión del parásito, así como de la viabilidad de la función reproductiva del mismo.

Debido a las diversas suposiciones que existen hasta la fecha con respecto a la patogenia, inmunología y causas que producen las diferentes lesiones tanto en músculo temporal como

testículo y epidídimo, en el siguiente trabajo se plantea la evaluación de la posible relación existente entre los aspectos clínicos y lesionales con la presencia del parásito y la respuesta inmune. Para ello, este primer ensayo se divide en los siguientes objetivos:

Objetivo 1. Descripción y caracterización histopatológica e inmunohistoquímica de las lesiones producidas por *Leishmania infantum* en el sistema reproductor masculino y el músculo temporal.

Objetivo 2. Influencia del estado general de los animales valorado mediante la clínica y el nivel de anticuerpos en sangre, sobre las características histológicas e inmunohistoquímicas de las lesiones.

Objetivo 3. Relacionar las características lesionales en tejido muscular y reproductor con la presencia y distribución del parásito determinada mediante inmunohistoquímica y PCR a tiempo real.

Por otro lado, los signos de peor pronóstico son los asociados al depósito de inmunocomplejos, especialmente la lesión renal producida por los mismos. Este es un factor de mal pronóstico en el control y en la evolución de esta enfermedad infecciosa, siendo en muchos casos, la causa principal de muerte del animal. Por ello, es vital analizar y conocer los mecanismos involucrados en la presentación de la misma.

Existe una falta de biomarcadores renales para identificar la insuficiencia de forma temprana, para así poder aplicar un tratamiento y mejorar el pronóstico. A pesar de la elevada prevalencia de dicha patología renal, los biomarcadores de uso habitual en suero, como son la urea y la creatinina, no tienen sensibilidad para detectar la enfermedad de manera temprana.

Cuando hay daño renal importante, tanto a nivel glomerular como tubular o intersticial, se detecta en orina un gran porcentaje de proteínas de alto y bajo peso molecular, sin embargo, cuando el daño es leve tiende a detectarse solo las de bajo peso molecular. En la mayoría de los casos el único indicador de afección renal es una proteinuria subclínica, la cual puede contribuir al desgaste muscular, caquexia y ocasionalmente, tromboembolismo pulmonar.

Habitualmente, el estudio del fallo renal se realiza mediante la determinación del UPC (proteína urinaria/creatinina) con objeto de valorar la proteinuria renal, sin embargo, esta analítica tiene la limitación de presentar una baja especificidad, siendo incapaz de determinar el origen de la misma y la gravedad de las lesiones producidas.

Teniendo en cuenta que una de las mejores medidas para evitar el fallo renal crónico observado en la leishmaniosis o asociado a cualquier otra etiología, es un diagnóstico precoz de lesiones

renales leves, que tienden a ser progresivas si no hay un tratamiento adecuado, existe una necesidad importante para su diagnóstico precoz. Además, en estos casos, conocer el grado o localización de la lesión de la que partimos a la hora de empezar un tratamiento o si empeora durante o después del mismo es de una importancia vital.

Toda esta información se puede obtener, como han demostrado diversos autores, mediante el estudio histopatológico de las muestras renales seriadas obtenidas por biopsia. Sin embargo, en la clínica diaria, no es una práctica muy común ya que los propietarios no suelen acceder a llevarla a cabo especialmente en pacientes sin signos clínicos renales asociados. Por ello, desde el punto de vista clínico, resultaría más práctico encontrar un biomarcador en orina o en plasma que facilitara esta información y se correlacionara al máximo con el grado de lesión renal.

En este sentido, en los últimos tiempos *Lcan* ha servido como modelo de lesión renal en la investigación de nuevos biomarcadores que se anticipan a la creatinina en la detección de la lesión renal.

Recientemente, se ha observado que el NGAL (proteína lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos) es un buen marcador de enfermedades tanto renales como extrarrenales, así como buen indicador de insuficiencia renal aguda y crónica, sin embargo, no existen datos de la eficacia de esta proteína como indicador de daño renal producido por *L. infantum*.

Así pues, en este trabajo se pretende realizar la descripción de las lesiones producidas en el riñón en perros en diferentes estadios de enfermedad renal producida por la infección experimental con *L. infantum* y relacionarlas con los valores de NGAL para determinar su utilidad como biomarcador de daño renal en la leishmaniosis canina. Debido a que este biomarcador es también resultado de procesos inflamatorios, su valoración se hará en el contexto del cuadro lesional de los órganos anteriormente estudiados.

Por todo ello, este ensayo se divide en tres objetivos fundamentales:

Objetivo 1. Descripción de las lesiones producidas en riñón debidas a la infección experimental por *Leishmania infantum* en perros.

Objetivo 2. Avances en la detección precoz de daño renal en perros infectados con *Leishmania infantum* en diferentes fases de la enfermedad mediante la valoración de la proteína NGAL en orina.

Objetivo 3. Relación entre el ratio NGAL/Crea urinaria y las lesiones histológicas halladas en perros con *Leishmania infantum*.

Objetivo 4. Relación entre la proteína NGAL detectada en orina y la intensidad de inflamación detectada en tejido muscular y reproductor masculino debida a la infección por *Leishmania infantum*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En 1903 William Leishman y Charles Donovan identificaron por primera vez y por separado que un parásito microscópico era el causante de la forma visceral mas peligrosa de la leishmaniosis, la que en la india llamaban Kala Azar, que significa Kala “negra, impura” y azar “fiebre” en sánscrito. Seis años más tarde, Lindenberg (1909) describió un parásito aparentemente idéntico, responsable de lesiones cutáneas que ya había sido representado en los llamados huacos, figuras precolombinas de barro del siglo I. En consecuencia, al relacionar este protozoo con el kala azar, Leishman y Donovan crearon el género *Leishmania*.

En 1908, Nicolle y Comte realizaron la primera descripción en el perro en Túnez. Desde entonces, el conocimiento de este grupo de enfermedades ha avanzado enormemente, mejorando la comprensión que se tiene sobre las mismas.

Por otro lado, en 1915 se sospechaba de los flebotomos como vectores de la enfermedad (Sargent 1915) apoyándose en el descubrimiento de la transmisión de otros parásitos unicelulares por insectos, como es el caso del paludismo (Ross 1898) y de la tripanosomiasis africana (Bruce 1903). Pasaron mas de diez años hasta que se logró transmitir el parásito a animales de laboratorio mediante la picadura de un flebotomo (Knowles 1924) y, a principios de los años 40 se obtuvo la prueba experimental de la transmisión de *Leishmania spp* por un flebotomo a un ser humano (Alder y Ver 1941) (WHO, 2010).

2.2. ETIOLOGÍA

2.2.1. EL PARÁSITO

2.2.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La leishmaniosis está causada por un protozoo parásito del género *Leishmania*. Dentro del Reino Protista, el género *Leishmania* se encuentra incluido en la Clase Zoomastigophorea, correspondiente a los protozoos flagelados que carecen de actividad fotosintética. Su clasificación taxonómica se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Leishmania* (Levine 1980)

Reino	Protista (Haeckel, 1866)
Subreino	Protozoa (Goldfuss, 1817)
Filum	Sarcomastigophora (Honigberg and Balamuth, 1963)
Subfilum	Mastigophora (Deising, 1866)
Clase	Zoomastigophorea (Calkins, 1909)
Orden	Kinetoplastida (Honigber, 1963)
Suborden	Trypanosomatina (kent, 1880)
Familia	Trypanosomatidae (Doflein, 1901)
Género	<i>Leishmania</i> (Ross, 1903)

Dentro del género *Leishmania* se han realizado diversas clasificaciones. Las propuestas entre 1916 y 1987 estaban basadas en caracteres jerárquicos, llamadas linneanas montéticas.

Es en 1987 cuando Lainson y Shaw dividieron el género *Leishmania* en dos subgéneros en función del lugar de reproducción en el tracto digestivo del vector. Por un lado el subgénero *Leishmania*, con multiplicación de los flagelados en el intestino medio y presente tanto en el Viejo Mundo como en el Nuevo Mundo. Y, por otro lado, el subgénero *Viannia*, con multiplicación en el intestino distal y restringida al Nuevo Mundo

Posteriormente, las clasificaciones filogenéticas revelaron relaciones parentales entre las diferentes especies de *Leishmania*, confirmadas por la utilización de diversos marcadores moleculares. Estos métodos confirmaron la división en dos subgéneros establecida por Lainson y Shaw, y la concordancia validó los criterios de identificación extrínsecos (aquellos que hacen referencia a las características externas del parásito, es decir al fenotipo) e intrínsecos (los que analizan el genoma del parásito). En la Figura 1 se muestra la posición taxonómica de las especies descritas en la actualidad en el ser humano. Se están estudiando varias especies no clasificadas, algunas de las cuales causan enfermedad en el ser humano (WHO 2010).

Desde los años ochenta se han utilizado también clasificaciones fenéticas adansonianas, que se basan en que las categorías taxonómicas se establecen valorando el mayor número posible de datos informativos basados en todos los caracteres posibles.

En la actualidad, los métodos de indentificación más utilizados se basan en el estudio del fenotipo, como isoenzimas y anticuerpos monoclonales. Y también del genotipo, como el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), la hibridación con sondas de ácidos nucleicos y las técnicas de amplificación de DNA, que estudian directamente el genoma, siendo por tanto más sensibles y específicas.

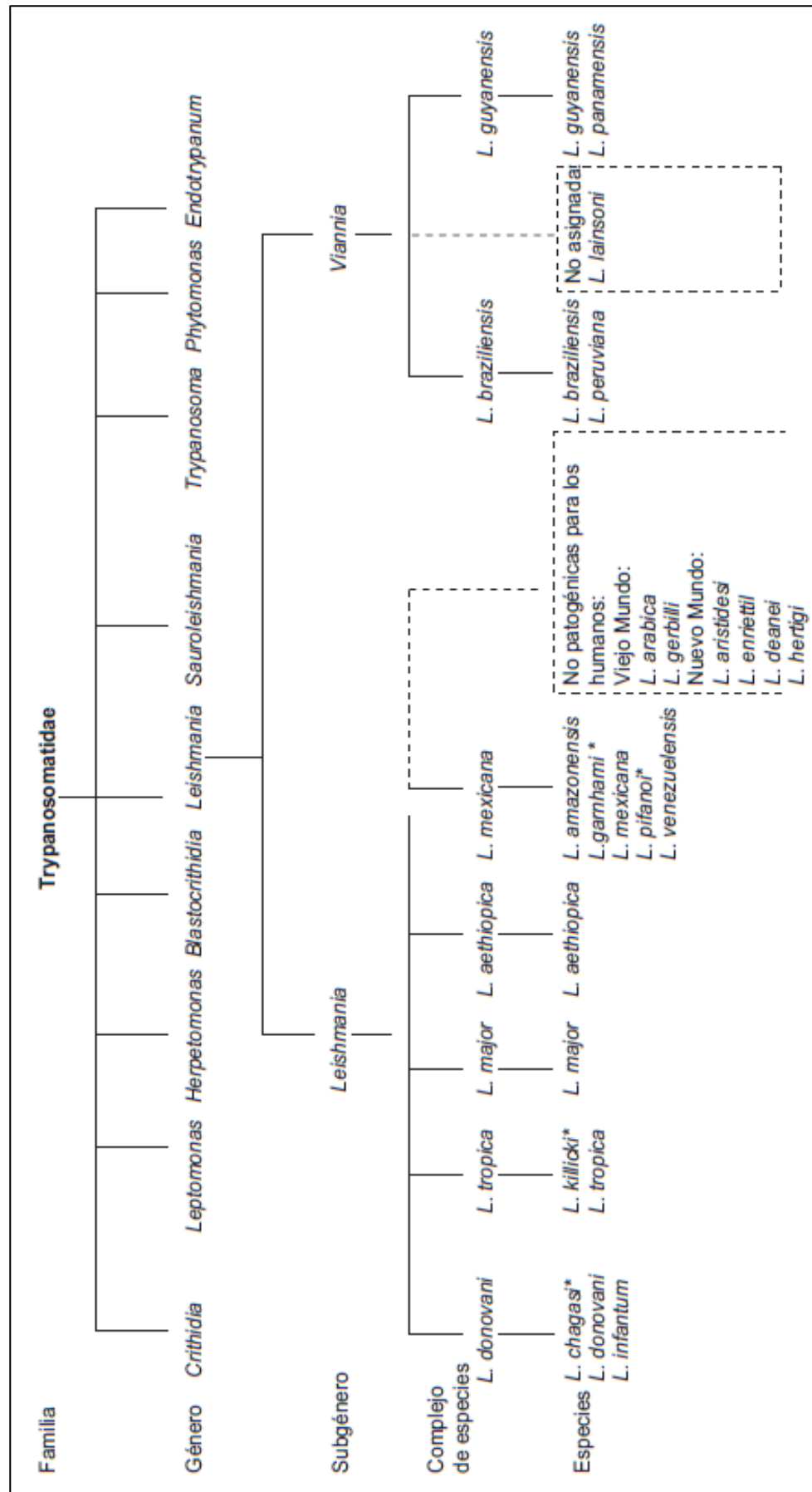


Figura 1. Clasificación del género *Leishmania*, basada en caracteres intrínsecos (isoenzimas) y taxonomía numérica (WHO, 2010). *Especies sometidos a reclasificación. *L. chagasi* en el Nuevo Mundo es sinónimo de *L. infantum* en el Viejo Mundo

La clasificación fenotípica basada en la electroforesis de isoenzimas del parásito se considera la técnica de identificación de referencia para la clasificación del género y la identificación a nivel específico e intraespecífico, desde un punto de vista taxonómico. Las isoenzimas se consideran formas alélicas diferentes de un gen, y la variación enzimática en un determinado locus puede interpretarse como una mutación que se produjo durante la evolución. Así, los parásitos de la misma especie que poseen idéntico patrón enzimático pertenecen al mismo zimodema (Hide *et al.*, 2001), denominándose con el acrónimo “MON”. Su mayor limitación técnica reside en la necesidad de aislar parásitos en cultivo y en el reducido número de centros que actualmente realizan la caracterización fenotípica.

L. infantum incluye 31 zimodemas, siendo el zimodema MON-1 el responsable de la mayoría de las infecciones en el perro (Gállego *et al.*, 2001), considerado su principal reservorio, y responsable del 90% de los casos de LV en humanos (WHO, 2010).

2.2.1.2 MORFOLOGÍA

Leishmania es un protozoo flagelado perteneciente al orden kinetoplastida y a la familia tripanosomatidae, y como todos los protozoos pertenecientes a este orden presentan un DNA genómico localizado en tres compartimentos: en el núcleo celular, como DNA cromosómico encargado de la multiplicación del parásito, en la mitocondria llamado DNA del kinetoplasto (DNAk) que se divide independientemente y un DNA extracromosómico situado en el citoplasma.

El kinetoplasto es una estructura dentro de la membrana mitocondrial, situada en la base del flagelo y de carácter inusual en la naturaleza que está presente en todos los protozoos del orden Kinetoplastida. Es un disco visible al microscopio óptico con un diámetro de 1-2 µm. Contiene aproximadamente 107 pares de bases. Representa hasta el 20% de todo el DNA del parásito y está formado por una red de moléculas circulares (maxicírculos y minicírculos) concatenadas covalentemente (Killick-kendrick, 1990).

Las secuencias de los minicírculos pueden variar por mutación o recombinación con otras cadenas de minicírculos ya existentes, lo que se traduce en una variabilidad relativamente alta. Sin embargo, se ha comprobado la homogeneidad y estabilidad de ciertas secuencias de minicírculos, pertenecientes a una misma clase de leishmanias geográficamente muy distantes, así como dentro de la misma especie (Lambson y Barker, 2002).

Leishmania es un parásito digenético (heteroxeno), con formas flageladas (promastigote y paramastigote) cuando se encuentra en el tracto digestivo del insecto, y formas aflageladas

(amastigotes redondeados) que viven y se multiplican de forma obligada en las células macrofágicas de los vertebrados. Las características morfológicas de los distintos estadios del ciclo de vida del parásito son:

-Amastigote: Esta forma de presentación intracelular se aloja en la vacuola parasitófora del macrófago del hospedador vertebrado. Una vez en su interior, adquiere su forma típica ovalada durante las primeras 24 horas. Su tamaño es de 2 a 3 μm y carece de flagelo externo (Figura 2)

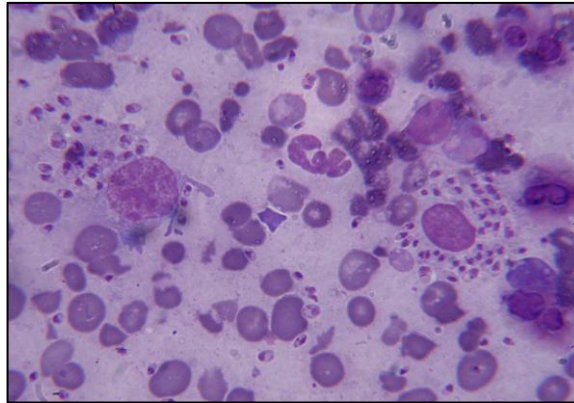


Figura 2. Amastigotes de *L. infantum* en el interior de un macrófago

-Promastigote: El cuerpo es alargado (15-24 μm x 2-4 μm), presenta un único flagelo y tiene el kinetoplasto muy próximo al núcleo celular. Existen diferentes formas no infectivas de promastigotes con capacidad de multiplicarse (procíclicos, nectomas, leptomas, haptomas y paramastigote) (Nieves y Rondón, 2007). La forma infectiva para el hospedador vertebrado es el promastigote metacíclico que se encuentra en la hipofaringe y la probóscide del díptero en condiciones de poder ser inoculado (Sack y Perkins, 1984) (Figura 3).

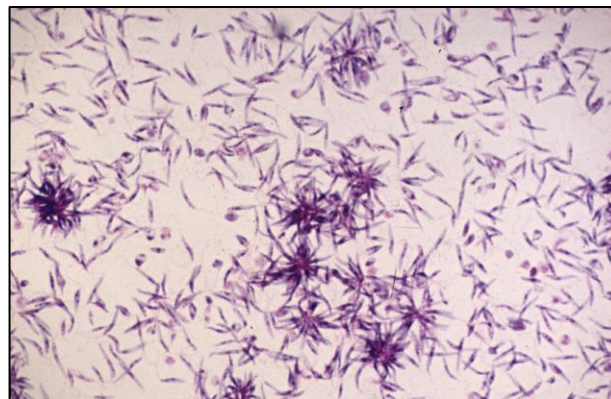


Figura 3. Promastigotes en medio de cultivo

2.2.2 EL VECTOR

El ciclo natural de la infección por *Leishmania* implica, como se ha mencionado anteriormente, un hospedador vertebrado y un vector.

Los flebotomos son vectores de varios agentes infecciosos y parasitarios como *Phlebovirus*, *Vesiculovirus*, *Bartonella bacilliformis* y *Leishmania spp.* Las hembras son los únicos insectos capaces de transmitir las especies del género *Leishmania* conocidas (Killick-Kendrick, 1990).

2.2.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN

Son insectos pertenecientes al orden Díptera, familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae, que pertenecen al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo o al género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Se han identificado 98 especies de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* como vectores confirmados o sospechosos de leishmaniosis canina y humana (Maroli *et al.*, 2013)

La subfamilia Phlebotominae, en Europa, está representada por dos géneros: *Phlebotomus* y *Sergentomyia*. Diferentes especies del Género *Phlebotomus* están relacionadas con la transmisión de las diversas especies de *Leishmania* entre mamíferos, mientras que el Género *Sergentomyia* es un reconocido vector de *Sauroleishmania* de reptiles, aunque recientemente se sospecha de su posible implicación en la transmisión de *Leishmania infantum* en Senegal (Senghor *et al.*, 2011). La Tabla 2 recoge su posición taxonómica.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de los flebotomos vectores de *L. infantum* (Killick-Kendrick, 1999).

Reino	Animalia
Tipo	Arthropoda
Subtipo	Mandibulata
Clase	Insecta
Orden	Diptera
Suborden	Nematocera
Familia	Psychodidae
Subfamilia	Phlebotominae
Género	<i>Phlebotomus</i> , <i>Sergentomyia</i>

En Europa existen nueve especies de flebotomos autóctonos *P. ariasi*, *P. perniciosus*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus*, *P. tobbi*, *P. kandelaki*, *P. balcanicus*, *P. papatasi* y *P. sergenti*, consideradas vectores demostrados o potenciales de *L. infantum* (Antoniou *et al.*, 2013).

En España, la especie más abundante y ampliamente repartida es *Phlebotomus perniciosus*, del que se ha aislado en diversas ocasiones el parásito (Marín Sanchez *et al.*, 1994). Este vector es abundante por prácticamente todo el territorio peninsular, excepto en la cornisa cantábrica, en todas las Islas Baleares, y también en las Islas Canarias, donde no parece ser muy frecuente. Ocupa gran variedad de hábitats y se localiza desde el nivel del mar hasta en zonas de montaña. La otra especie con capacidad para transmitir *Leishmania infantum* en España es *Phlebotomus ariasi* (Guilvard *et al.*, 1996). Presenta casi la misma distribución geográfica que *Phlebotomus perniciosus* pero tiene preferencias por zonas climáticas más húmedas siendo menos abundante en ecosistemas áridos. Ambas especies son muy frecuentes en ambientes urbanizados. Existe una tercera especie del subgénero *Larroussius* presente en España que es *Phlebotomus langeroni*. Por el momento se conoce muy poco de su distribución en nuestro país. Está más relacionada con ambientes naturales y zonas muy xerofílicas. Hasta el momento solo se conoce su presencia en contadas localidades de las provincias de Madrid, Zaragoza y Granada. Aunque hasta la fecha no se ha descrito en España su implicación en la transmisión de la leishmaniosis, sí que se ha comprobado su papel vectorial en la transmisión del parásito en el Norte de África desde Egipto a Túnez (Guerbouj *et al.*, 2007).

2.2.2.2 MORFOLOGÍA

Los flebotomos son insectos de dos alas que presentan una metamorfosis completa u holometábola pasando por los estadios de huevo, larva, pupa e imago o insecto adulto volador. Son insectos que miden entre 2 y 3 mm de longitud, de color beige oscuro o marrón claro, pudiendo observarse al microscopio abundantes sedas distribuidas por todo el cuerpo. La cabeza es de implantación algo inferior en el tórax, lo que le proporciona un aspecto giboso, tienen unos grandes ojos facetados negruzcos y largas antenas formadas por 14 artejos. Las patas son largas y frágiles, y las alas lanceoladas con la venación propia de la subfamilia y lo más característico es que cuando están posados o están picando, las alas las dejan separadas del cuerpo, levantadas en una posición abierta formando como una “uve” (Figura 4).

Los machos se distinguen a simple vista porque presentan el extremo posterior del abdomen engrosado debido a que poseen unos apéndices articulados que forman la genitalia externa y permite distinguirlos fácilmente de las hembras que tienen el extremo del abdomen más afinado.



Figura 4. A: Hembra de *P. perniciosus* alimentada,

Son estas estructuras ligadas con la cópula las que permiten diferenciar los machos de las distintas especies de flebotomos, en especial la morfología de los edeagos o valvas copuladoras. Las hembras también se diferencian por estructuras genitales internas como son las espermatecas, combinadas con la morfología de la faringe y la armadura cibarial (Lucientes, 2017).

2.2.2.3 TRANSMISIÓN

Existe una estrecha relación entre las especies de vector y las especies de *Leishmania* transmitidas, relacionada con la capacidad de los promastigotes para asociarse específicamente a ligandos en el intestino del flebótomo y evitar así ser liberados en las heces del vector (Volf *et al.*, 2008).

La capacidad de un perro infectado por *Leishmania* para infectar a los flebotomos no depende de su estado clínico. Tanto los perros clínicamente enfermos como los subclínicamente infectados pueden transmitir *Leishmania* a los flebotomos. Sin embargo, la proporción de flebotomos infectados mediante xenodiagnóstico en un perro incrementa con la presencia y gravedad de sus signos clínicos (Molina *et al.*, 1994). Además, se ha encontrado una fuerte correlación positiva entre la capacidad de infección de los perros y sus altos niveles de anticuerpos específicos en sangre (Courtenay *et al.*, 2014).

Por otro lado, la transmisión sostenida de *Leishmania spp.* en una población no suele ocurrir en ausencia de vectores. Sin embargo, la proporción relativamente baja de flebotomos infectados con *L. infantum* parece ser suficiente para mantener la infección en áreas endémicas (Quinell y Courtenay, 2009).

Existe una gran especificidad cuando hablamos de los vectores de la leishmaniosis, pues los flebotomos son los únicos artrópodos en los que se ha demostrado que *Leishmania* se multiplica

activamente y adopta la forma que resulta infectante para los hospedadores vertebrados (Killick-Kendrick, 1990). Con técnicas de biología molecular se puede detectar DNA del parásito en otros artrópodos hematófagos (garrapatas de cuerpo duro, pulgas, otras familias de dípteros) que se han alimentado de vertebrados infectados por *Leishmania*, pero nunca se ha demostrado que exista multiplicación en estos artrópodos ni transmisión de tipo mecánico. (Coutinho *et al.*, 2005, Coutinho y Linardi, 2007).

2.2.3 CICLO BIOLÓGICO

Leishmania tiene un ciclo de vida dimórfico; un estado extracelular de promastigote que se multiplica y desarrolla en el tracto digestivo del flebótomo (hospedador intermediario), y un estado intracelular denominado amastigote que residen y multiplican en vacuolas fagolisosomales de los fagocitos de mamíferos (hospedadores definitivos).

El esquema general del ciclo (Figura 5) sitúa en primer plano a las hembras del insecto vector, hematófagos. A consecuencia de la infección se suceden los siguientes pasos: la hembra, al alimentarse de un animal vertebrado, le inocular formas infectivas del parásito. Una vez en el interior de los fagocitos mononucleares, principalmente macrófagos, ya redondeado y en forma de amastigote, es englobado por una vacuola parasitófora para intentar eliminarlo mediante una cascada de metabolitos derivados del oxígeno que son vertidos en el espacio intravacuolar. Sin embargo, *Leishmania* evade esas reacciones inmunológicas inespecíficas y sobrevive y se multiplica por fisión binaria. La infección se extiende cuando las células parasitadas se rompen y liberan los amastigotes, que a su vez son fagocitados por otros macrófagos continuando así la multiplicación. También ocurre cuando los macrófagos infectados se dividen dejando los parásitos en las células hijas. Desde aquí se diseminan a través de la piel o del torrente sanguíneo y linfático a órganos ricos en células macrofágicas como son los linfonodos, la médula ósea, el hígado y el bazo principalmente (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

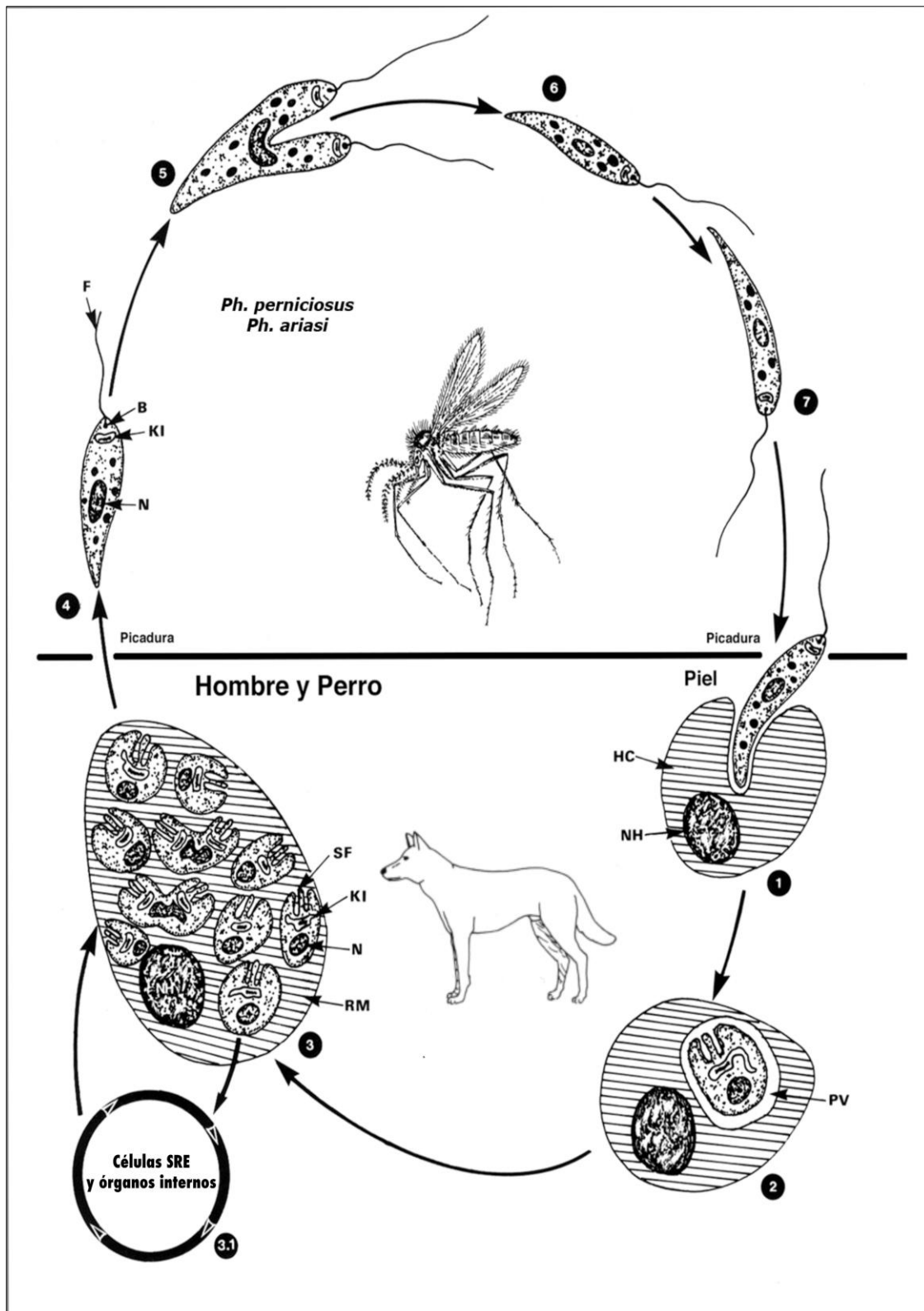


Figura 5. Ciclo biológico de *L. infantum*

Si los parásitos sobreviven, podrán ser ingeridos por otros flebotomos volviéndose a repetir de nuevo el ciclo, teniendo una duración aproximada de 10 días (Moody *et al.*, 1993). La hembra del insecto vector se infecta cuando se alimenta de sangre del hospedador mamífero ya que le es necesaria para la inducción de la ovogénesis.

Respecto al ciclo en el vector, durante la fase de alimentación de sangre, el parásito se localiza en la parte posterior del intestino medio, siendo la infección inmadura y no transmisible. El desarrollo en el intestino continúa durante 1-2 semanas resultando en la infección transmisible con promastigotes metacíclicos localizados en la parte anterior del intestino. Dependiendo del parásito y la especie del vector hay ingestiones de sangre adicionales durante el periodo de maduración, pero la mayoría de los parásitos pueden completar su desarrollo dentro del periodo de un solo ciclo digestivo. Durante la maduración suplementan su nutrición mediante azúcares de las plantas, lo que se conoce como fase de alimentación de azúcar del desarrollo del parásito. Los promastigotes metacíclicos infectivos son transmitidos cuando la hembra flebotomo se alimenta de nuevo de sangre.

2.3 EPIDEMIOLOGÍA

2.3.1 IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LA LEISHMANIOSIS A NIVEL MUNDIAL

El término leishmaniosis engloba un espectro de enfermedades parasitarias causadas por protozoarios de las diferentes especies del género *Leishmania* y se considera una de las enfermedades parasitarias más importantes después de la malaria y la filariasis linfática. Se transmite por insectos hematófagos de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus*.

Forma parte de las enfermedades tropicales olvidadas o desatendidas (NTDs) que son un grupo muy diverso de infecciones causadas por varios patógenos como parásitos, virus y bacterias principalmente extendidas entre las poblaciones más desfavorecidas del planeta. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido como prioritarias 17 NTDs endémicas en 149 países. Es una enfermedad que se asocia con la pobreza y a la escasez de recursos disponibles para su control, diagnóstico y tratamiento. Factores como la malnutrición, la mala condición de las viviendas, la falta de higiene, la inmunodepresión, la coinfección con VIH y la falta de atención sanitaria predisponen a padecer esta enfermedad en países en vías de desarrollo. Además, la industria farmacéutica no ha logrado desarrollar nuevos fármacos eficaces incrementando la dificultad en el control de esta enfermedad (Desjeux, 2004; Dujardin *et al.*, 2008).

La leishmaniosis se encuentra en regiones tropicales y subtropicales y es endémica en 98 países, estimándose una incidencia mundial anual de dos millones de casos nuevos, de los cuales 500.000 son debidos a leishmaniosis visceral, la forma más grave y a menudo mortal de la enfermedad (WHO, 2017). Se considera una zoonosis que afecta a animales y al hombre, y aunque éste es un hospedador accidental, la leishmaniosis humana tiene una distribución muy amplia en todos los continentes excepto en algunas islas del Pacífico, Australia y la Antártida (Dereure *et al.*, 1999).

El género *Leishmania* cuenta con más de 20 especies diferentes que, dependiendo de la especie y de la respuesta inmune del hospedador, da lugar a tres formas clínicas típicas (WHO, 2017). Así, en función del área geográfica y del tipo de forma clínica que desarrollan, la leishmaniosis puede clasificarse en tres grupos:

-Leishmaniosis visceral (LV): es la forma más grave de la enfermedad, también conocida como kala-azar. Se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepato-esplenomegalia y anemia, pudiendo llegar a ser mortal si no se trata. En el Viejo Mundo predominan las especies *L. infantum* y *L. donovani* y en el Nuevo Mundo *L. chagasi*. Es altamente endémica en el subcontinente indio y África oriental. Se estima que cada año se producen en el mundo entre 50 000 y 90 000 nuevos casos de leishmaniasis visceral. En 2015, más del 90% de los nuevos casos notificados a la OMS se produjeron en siete países: Brasil, Etiopía, India, Kenya, Somalia, Sudán y Sudán del Sur. Los programas de eliminación del kala-azar en Asia Sudoriental están haciendo progresos continuos, y el número de casos está disminuyendo en los tres países endémicos principales: Bangladesh, India y Nepal.

-Leishmaniosis cutánea (LC): es la forma más frecuente de leishmaniosis. En las zonas expuestas al cuerpo produce lesiones cutáneas, sobre todo ulcerosas que dejan cicatrices de por vida y son causa de discapacidad grave. Las especies *L. major*, *L. trópica* y *L. aethiopica* son las predominantes en el Viejo Mundo y *L. braziliensis* y *L. mexicana* lo son en el Nuevo Mundo. Aproximadamente un 95% de los casos de leishmaniosis cutánea se producen en el continente americano, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central. Más de dos terceras partes de los casos nuevos aparecen en seis países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, República Islámica de Irán y República Árabe Siria. Se calcula que cada año se producen en el mundo entre 0,6 millones y 1 millón de casos nuevos.

-Leishmaniosis mucocutánea: esta forma conduce a la destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta. Más del 90% de los casos de leishmaniosis mucocutánea se producen en el Brasil, Bolivia, Etiopía y el Perú

En la Figura 6 se describen los 25 países seleccionados en base al número de casos de leishmaniosis que reportaron en el año 2013, y fueron escogidos porque reportaron más de 100 casos de leishmaniosis visceral y / o más de 2.500 casos de leishmaniosis cutánea (WHO 2016).

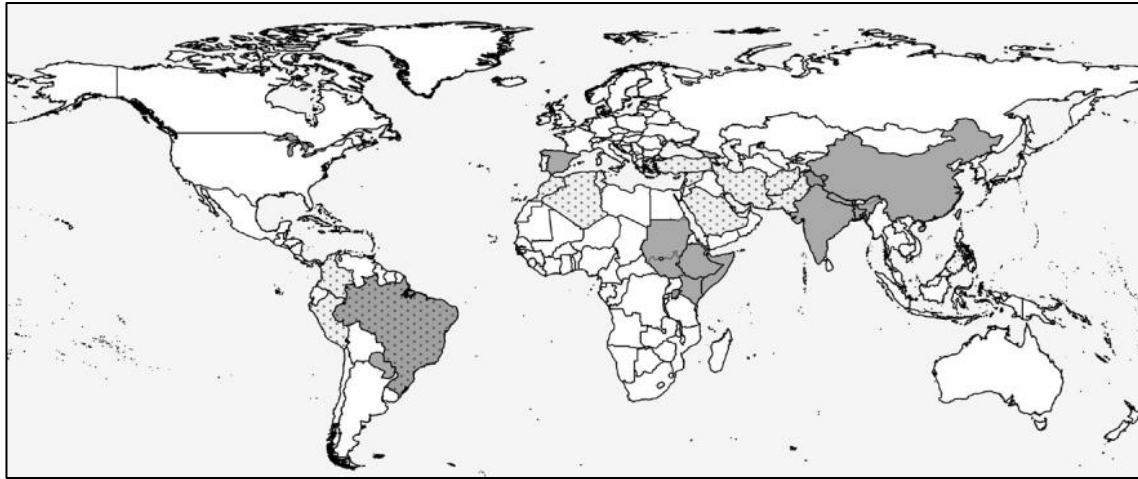


Figura 6. Países con alta carga en leishmaniosis cutánea y visceral. Punteado: países que han reportado más de 2500 casos de leishmaniosis cutánea. Fondo gris: países que reportaron más de 100 casos de leishmaniosis visceral. WHO 2016.

En cuanto a la leishmaniosis humana en nuestro país hay que señalar que, a pesar de que en zonas endémicas un alto porcentaje de la población es picado por flebotomos infectados, la casuística de la enfermedad es muy baja. Ello es debido a que, en condiciones normales de salud, nuestra respuesta inmunitaria frente a la infección es intensa y eficaz, siendo capaz de impedir la expresión de los síntomas; de hecho, un elevado porcentaje de los casos clínicos se asocian a estados de inmunosupresión, como co-infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Así, desde el año 1996 hasta el 2011, en España la incidencia media anual notificada estuvo alrededor de 0,45 casos / 100.000 habitantes (Amela *et al.*, 2012)

2.3.2 IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

El perro es el principal reservorio para la infección por *L. infantum*, tanto en perros como en humanos, en las regiones geográficas donde la leishmaniosis visceral zoonótica es endémica. Aunque se ha confirmado el papel como reservorio de *L. infantum* en los perros, existe controversia sobre su rol en el mantenimiento y la transmisión de otras especies de *Leishmania*, que es probablemente insignificante.

Nicolle y Comte fueron los primeros en describir casos de *L. infantum* en perros en 1908, en Túnez (Rioux *et al.*, 1980). Se han identificado varias especies de *Leishmania* en perros de distintas partes del Viejo Mundo (África, Asia, y Europa) y del Nuevo Mundo (América). Hoy en día se

acepta que *L. infantum*, el agente causal de la leishmaniosis visceral en el Viejo Mundo, y *L. chagasi*, su homólogo en el Nuevo Mundo, son la misma especie (Mauricio *et al.*, 2000).

La infección por *L. infantum* en perros es endémica en más de 70 países del mundo pero se desconoce la prevalencia global en perros domésticos (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Se han descrito casos de enfermedad en zonas libres debido a la importación de perros infectados de zonas endémicas. Este es el caso de Australia, Japón, la Guayana francesa y Angola (Maia y Cardoso, 2015). En los últimos años, se han descrito unos 700 casos importados en países de Europa considerados tradicionalmente no endémicos, al norte de regiones con Lcan (Antoniou *et al.*, 2013). En este punto, es importante tener en cuenta que, en ausencia de medidas profilácticas, la introducción de perros infectados en áreas previamente libres de Lcan y con un vector competente, puede resultar en el establecimiento persistente de *L. infantum* (Maia y Cardoso, 2015).

La Lcan es endémica en todos los países de la cuenca mediterránea, incluyendo Portugal, España, Francia, Italia, Grecia, Croacia, Albania, Malta, Chipre y Turquía. (Dujardin *et al.*, 2008; Schallig *et al.*, 2013). Los cambios socioeconómicos y climáticos están facilitando su expansión a nuevas localizaciones en Europa, principalmente hacia el norte, ya sea por la contigüidad territorial, a menudo asociada al calentamiento global que favorece la transmisión vectorial, o bien por la importación de perros infectados (Maia y Cardoso, 2015). Así, en estos países, la Lcan se puede considerar una enfermedad vectorial emergente (Dantas-Torres *et al.*, 2012; Ready *et al.*, 2014).

En España desde mediados de los años 80, los estudios epidemiológicos en la población canina muestran un amplio rango de seroprevalencias, desde 0% en Asturias y Vizcaya hasta un 65% en Barcelona lo que pone de manifiesto su distribución parcheada (Miró *et al.*, 2013). Las diferencias halladas entre las diferentes comunidades autónomas pueden deberse al tamaño de la muestra y las técnicas serológicas empleadas. Los casos detectados en las islas Canarias procedían de la Península o habían viajado a zonas endémicas (Pou-Barreto *et al.*, 2013).

2.3.3 VIAS DE TRANSMISIÓN DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

Los flebotomos son los únicos artrópodos adaptados para la transmisión biológica de la infección por *Leishmania spp.* Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, algunos autores han elevado la capacidad vectorial de otros artrópodos hematófagos, como ixódidos de la especie *Rhipicephalus sanguineus*, pulgas de la especie *Ctenocephalides felis felis* y, mas recientemente la

mosca del caballo, *Tabanus importunus* y *Culicoides spp*, sin haberse demostrados su papel en la transmisión natural de *Leishmania* y ni siquiera su capacidad infectante (Lucientes, 2017).

La presencia de amastigotes en semen descrita por diversos autores (Diniz *et al.*, 2005; Boechat *et al.*, 2016) sugiere la vía venérea como transmisión de la enfermedad. Los machos enfermos presentan lesiones inflamatorias donde es posible evidenciar la presencia de amastigotes, en el epidídimo, el glándula, prepucio, testículo y próstata, pudiendo desarrollar una inflamación crónica en dichos tejidos (Diniz *et al.*, 2005; Manna *et al.*, 2012; Gomes de Oliveira *et al.*, 2016). La transmisión sexual en perros tiende a ser unidireccional, siendo mas eficiente desde macho infectados a hembras susceptibles (Turchetti *et al.*, 2014)

Respecto a la transmisión vertical, bien transplacentaria o lactogénica, se ha demostrado de forma experimental y en perros con infección natural tanto en regiones endémicas como no endémicas (Rosypal *et al.*, 2005, Naucke y Lorentz, 2012). En regiones endémicas, se desconoce la frecuencia de esta transmisión vertical debida a la alta probabilidad de contacto con el vector (Mancianti *et al.*, 1988).

Por otro lado se ha propuesto la transmisión directa entre perros, a través de mordeduras o heridas, en ausencia de vectores competentes. Esto explicaría la existencia de casos en zonas no endémicas como es el caso de Estados Unidos (Duprey *et al.*, 2006), Finlandia (Karkamo *et al.*, 2014) y Nueva Caledonia (Daval *et al.*, 2016).

Y, por último, también es una vía a tener en cuenta la transfusión de sangre, teniendo vital importancia en zonas donde donantes de sangre podrían ser portadores de la infección (Tabar, 2008).

2.3.4 MODELOS EXPERIMENTALES

Para el estudio de la Leishmaniosis se han desarrollado diversos modelos experimentales cuyos fines han sido estudiar la inmunopatología de la LV en humanos, realizar ensayos clínicos preliminares de nuevas moléculas terapéuticas y vacunas aplicables tanto en perro como en humanos.

En las infecciones naturales, el flebotomo introduce en la piel un número muy pequeño (posiblemente alrededor de 100 a 1.000) de promastigotes metacíclicos junto con su saliva fuertemente biorreactiva, mientras que en las infecciones experimentales, se inyectan millones de promastigotes obtenidos de cultivos o amastigotes derivados de tejidos.

Además el punto de inoculación es superficial y el inóculo de parásitos infectivos es probablemente muy bajo, en contraste con las infecciones de laboratorio en las que se inoculan volúmenes relativamente grandes, de 50µl o más, en la hipodermis o por vía intravenosa (Handman, 2001). La ausencia de modelos definitivamente concluyentes, ha llevado a proponer la utilización de distintas vías de infección en el mismo animal (Grimm *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 2000), además de la evaluación de la eficiencia de diversas especies animales.

El requisito principal que debe cumplir un modelo de infección experimental es inducir la infección en todos los animales (Fernández-Cotrina *et al.*, 2013). Los modelos que se han empleado para la investigación son: diferentes extirpes de ratones, cricetos, perros e incluso primates.

En primer lugar, los primates se han usado como modelos para el estudio de la leishmaniosis cutánea producida por *L. amazonensis* (Kenney *et al.*, 1999); sin embargo los resultados de las pruebas de hipersensibilidad son distintos de los obtenidos en los humanos. Entre las especies empleadas se encuentran los monos ardilla, macacos y aotus (Garg y Dube, 2006).

Por otro lado, el modelo murino en la infección por *Leishmania* spp. es particularmente útil para entender el papel de la respuesta inmune del hospedador en el establecimiento de la susceptibilidad o resistencia a la infección (Pereira y Alves, 2008; Sharma y Singh, 2009). A pesar de la utilidad comprobada del modelo ratón para el estudio de la leishmaniosis, hay que tener en cuenta que no reproduce la enfermedad observada en perros o humanos, por lo que representa un modelo mejor de infección subclínica. En cambio, existen líneas de ratones modificados genéticamente que son susceptibles a la leishmaniosis, muy empleados en el estudio de la enfermedad (Mc Kenzi *et al.*, 1998; Rodríguez-Sosa *et al.*, 2001).

El hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), por el contrario, desarrolla una enfermedad progresiva en la que los parásitos se multiplican en diferentes órganos, lo que conduce generalmente a la muerte. Reproduce la clínica y patogénesis de la enfermedad en humanos y perros, siendo para algunos autores el mejor modelo experimental tanto de LV humana como canina (de Oliveira *et al.*, 2004, Gomes-Silva *et al.*, 2013). De hecho fue uno de los primeros modelos utilizados para el estudio de la Leishmaniosis visceral.

El perro constituye un modelo de estudio de la leishmaniosis excelente, ya que actúa como hospedador natural, reservorio principal y es un buen modelo para estudiar la enfermedad en humanos debido a que presentan gran similitud en las alteraciones clínicopatológicas y respuestas inmunes frente al parásito.

Debe tenerse en cuenta que los resultados de la infección experimental dependen tanto de la respuesta inmunitaria del hospedador, como de la virulencia del aislado inoculado, dosis infectante y vía de inoculación (Moreno y Alvar, 2002).

La inoculación i.v. de una carga media-alta de promastigotes supone el modelo experimental ideal, ya que produce la infección en el 100% de los animales, así como un cuadro clínico temprano y patente en la mayoría de los perros, debido a la diseminación rápida de los parásitos vivos a diferentes órganos (Fernández-Cotrina et al., 2013). Respecto al tamaño del inóculo, en el modelo experimental, un número elevado de parásitos (10^8 - 10^9) suele inducir una respuesta homogénea en todos los individuos, mientras que concentraciones menores (10^5 - 10^6) tienden a dar lugar a respuestas clínicas heterogéneas (Moreno y Alvar, 2002).

Entre las diversas razas de perros empleadas, algunos autores afirman que los perros de raza Pastor Alemán son mejores modelos experimentales que los Beagles y perros mestizos. No obstante, se han descrito tasas de infección altas en perros mestizos (Abranches *et al.*, 1991), y los perros de raza Beagle son los que más se han empleado en infecciones experimentales, obteniéndose altas tasas de infección (Fernández-Cotrina *et al.*, 2013).

El principal problema de las infecciones experimentales es la naturaleza impredecible de la respuesta inmunitaria, hecho considerado por algunos investigadores como un reflejo del amplio abanico de respuestas clínicas observadas en las infecciones naturales. Los diferentes patrones clínicos tras la infección en los estudios se han observado incluso empleando perros de la misma raza (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2013).

2.4 INMUNOLOGÍA, PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS

La respuesta inmunitaria es clave en el curso de la infección por *Leishmania infantum* en perro ya que de esta dependen las diferentes manifestaciones clínicas: infección subclínica, enfermedad leve o moderada, o una enfermedad muy grave (Villanueva *et al.*, 2014)

Los factores más importantes que hacen que un perro avance hacia el control de la infección o hacia enfermedad clínica son el sistema inmunitario y la base genética, aunque también puede influir la edad, el sexo, el estado nutricional del perro, la virulencia de la cepa y la carga parasitaria en el perro infectado, así como la presencia de infecciones previas o enfermedades concomitantes. Además, existen evidencias de que hay razas en las que el desarrollo de signos clínicos es muy poco frecuente como es el caso del Podenco Ibicenco rústico y mestizos, y otras

en las que la enfermedad clínica es muy común (Pastor Aleman, Boxer Rottweiler y Cocker Spaniel) .

Asimismo, la situación de persistencia o susceptibilidad no es estática ya que cualquier situación de estrés, un tratamiento farmacológico o una enfermedad inmunosupresora concomitante, puede repercutir en el sistema inmunitario del perro, lo que puede derivar en que un perro capaz de controlar al parásito desarrolle finalmente la enfermedad clínica (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Cabe destacar la capacidad de esta enfermedad para establecerse de manera silenciosa, puesto que se caracteriza por producir pocos o ningún cambio en la respuesta inmune pese a la proliferación y diseminación parasitaria (leishmaniosis críptica). Esta característica ha sido reportada por otros autores como Santos-Gomes *et al.* (2002), en cuyo estudio los perros infectados experimentalmente expresaron citoquinas específicas en los primeros ocho meses además de la diseminación del parásito, pero sin signos clínicos de enfermedad. Esto puede ser debido a que el parásito evita las reacciones inmunológicas adversas del huésped mediadas por células.

2.4.1 RESPUESTA INMUNITARIA: INNATA Y ADQUIRIDA.

La inmunidad frente a la infección por *L. infantum* en perro es mediada por dos tipos de respuestas, la innata y la adquirida, donde una fagocitosis rápida es la clave inicial para la supervivencia el parásito y se ejecuta principalmente por neutrófilos, macrófagos y células dendríticas.

2.4.1.2 INMUNIDAD CELULAR INNATA

Los componentes de la inmunidad innata comprenden un conjunto de mecanismos de resistencia a la enfermedad que no son patógeno-específicos. Sin embargo, tienen componentes celulares y moleculares que identifican diferentes tipos de moléculas específicas frente a ciertos patógenos. Las células asociadas a la inmunidad innata como células dendríticas y macrófagos, se deshacen directamente del agente patógeno vía fagocitosis, o bien, inducen la producción de citoquinas, las cuales facilitan la eliminación de dichos patógenos. Este tipo de respuesta instruye el desarrollo de respuestas inmunes adaptativas de patógenos de larga duración (Hosein *et al.*, 2016).

En primer lugar, tras la picadura de la hembra de flebotomo se produce una reacción inflamatoria cutánea local, en la que intervienen células centinelas de la piel, como son las células

dendríticas, linfocitos T (LT) y B (LB) y macrófagos (Teixeira *et al.*, 2006). Estas células contienen receptores fagocíticos y receptores de tipo Toll (TLR) en su superficie, que inician la respuesta inmunitaria innata tras reconocer patrones moleculares conservados (PAMP) del parásito. Debido a que los parásitos son también organismos eucariotas, los TLR que reconocen PAMP parasitarios presentan un umbral de activación superior a los que reconocen a otros patógenos como bacterias y virus, de manera que el huésped infectado, en lugar de presentar episodios agudos puede llegar a soportar altas cargas parasitarias hasta que se activa su respuesta innata. Entre los pocos estudios existentes aplicados a la infección por *L. infantum* en perro se observó que los TLR tipo 2 y tipo 9 aumentan en perros infectados, destacando el TLR tipo 2 que aumenta en perros enfermos (Ordeix i Esteve y Fondati, 2013).

Tras la activación de linfocitos, células dendríticas y macrófagos se produce una cascada de citoquinas que inducen el reclutamiento de nuevos macrófagos, neutrófilos, y células “natural Killer” (NK), las cuales inician la cascada de la respuesta inmunitaria innata para combatir los parásitos en el lugar de la infección. Las citoquinas y las células reclutadas durante las primeras fases de la infección pueden condicionar la resistencia a la enfermedad (Teixeira *et al.*, 2006).

A continuación se describen brevemente las principales células implicadas en este tipo de respuesta:

-Neutrófilos: Los neutrófilos predominan durante los primeros días post-infección. Esta afluencia temprana ha demostrado ser beneficiosa para la supervivencia de *Leishmania* en el tejido infectado, utilizando los granulocitos como una puerta de entrada para alcanzar sus células diana de manera silenciosa pasando así desapercibidos (Van Zandbergen *et al.*, 2004). Además, hay evidencias de que los parásitos son capaces de infectar dichas células y replicarse en su interior. En perros susceptibles, la actividad fagocítica de los neutrófilos está aumentada pero su capacidad para eliminar los parásitos intracelulares está suprimida (Brandonisio *et al.*, 1996). Por otro lado, en un estudio realizado por Gomez Ocha *et al.*, (2010) se demostró que perros con enfermedad media o sin signos clínicos desarrollados tienen mayor actividad neutrofílica comparado con perros con enfermedad severa.

-Células dendríticas y natural killer: Las células dendríticas activadas a través de los receptores TLR producen interleucina 12 (IL-12), una citoquina proinflamatoria necesaria para activar las células NK (Schleicher *et al.*, 2007). Como se ha citado anteriormente, las células NK juegan un papel muy importante en las primeras fases de la infección, debido a su actividad citotóxica y a su producción del interferón γ (IFN- γ) necesario para activar la respuesta de los linfocitos T colaboradores de tipo 1 (Th1) en el linfonodo (Muller *et al.* 2001). Asimismo, las células

dendríticas migran al ganglio linfático regional donde ejercen de células presentadoras de antígeno para los linfocitos T inmaduros e inician la respuesta inmunitaria adaptativa. Las células T activadas migran después a la lesión, donde los macrófagos y células dendríticas regularán su función.

Estas células también activan su citotoxicidad mediante la secreción de IL-2 por parte de las células CD4 parásito específicas (inmunidad adquirida), lo que sugiere la existencia de una compleja interacción entre células del sistema inmune adaptativo y células del sistema inmune innato (Bihl *et al.*, 2010)

-Macrófagos: Los macrófagos son los segundos en llegar al punto de entrada del parásito. Entre sus múltiples funciones destacan su papel como: células diana para la replicación del parásito, ser células presentadoras de antígenos (CPAs) y fuente de citoquinas moduladoras de la respuesta inmune mediada por linfocitos T (LT). Una vez alcanzado el macrófago, los parásitos son englobados en un fagosoma que, tras la maduración y la fusión con lisosomas y endosomas, formará una vacuola parasitófora (Antoine *et al.*, 1998). En su interior, *Leishmania* es capaz de sobrevivir y multiplicarse gracias al desarrollo de mecanismos de evasión de respuesta inmune (Sacks y Sher, 2002).

2.4.1.3 INMUNIDAD ADQUIRIDA

Las poblaciones linfocitarias se dividen clásicamente en linfocitos B (LB) y linfocitos T, que forman parte de la inmunidad adquirida. Los linfocitos B son los responsables de la elaboración de respuesta humoral frente a *Leishmania infantum*, además de ser también CPAs. Ésta respuesta humoral en los perros se produce de forma exagerada y no es protectora. Además genera reacciones de hipersensibilidad tipo II y III originando lesiones tisulares.

2.4.1.3.1 RESPUESTA INMUNITARIA DE BASE CELULAR

En primer lugar, en la leishmaniosis canina, la inmunidad protectora está mediada por la acción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleuquina 2 (IL-2) y el interferón gamma (IFN- γ), secretados por los linfocitos T activados (Figura 7).

Los linfocitos T se caracterizan por detectar antígenos asociados a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) presentes en las CPAs. Según la función que el linfocito T desempeña y el CMH con el cual interacciona, estos pueden subdividirse en linfocitos T CD4 dependientes de CMH II, y linfocitos T citotóxicos CD8, con capacidad lítica, que se caracterizan

por reaccionar con el CMH I (Playfair y Bancroft, 2013.). Dicho de otro modo, las células T citotóxicas inducen la actividad leishmanicida de los macrófagos que, a través de la producción de óxido nítrico, por la inducción de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), eliminan el parásito.

Los linfocitos T CD4 juegan un papel fundamental en el resultado final y evolución en la infección. Estos fueron clasificados en linfocitos T CD4 Th₁ y Th₂ por Mossman *et al.* (1986). Así pues, existen dos tipos de respuesta mediada por estos linfocitos: la respuesta celular tipo Th₁, asociada a la inmunidad protectora y, otra respuesta humoral Th₂, asociada a la progresión o susceptibilidad de la enfermedad (Baneth *et al.*, 2008). En la LV en humana, se relaciona la IL-10 con la respuesta tipo Th₂ (Nylen y Sacks, 2007). Sin embargo, en la actualidad, no existe consenso en relación al posible papel que desempeñan en el perro las citosinas IL-4 e IL-10, establecidas como perfil Th₂ en el hombre.

De manera muy resumida se puede decir que, en aquellos perros con una respuesta inmunitaria protectora frente al parásito predomina un perfil con linfocitos T CD4, caracterizado por la producción de citoquinas de tipo Th₁. Lo que induce la síntesis y liberación de moléculas con actividad anti-*Leishmania*, quedando controlada la diseminación del parásito y, por tanto, la infección. Por otro lado, en perros susceptibles se incrementa la actividad humoral, además de reducirse la inmunidad celular, con predominio de linfocitos T CD4 con un perfil mixto de citoquinas de tipo Th₁/Th₂ (Carrillo y Moreno 2004).

En la actualidad, bajo la denominación de linfocitos T CD4, se engloban diferentes tipos de células con características diferentes: Linfocitos T reguladores (Treg), Linfocitos Th₁, Linfocitos Th₂, linfocitos Th₁₇, linfocitos Th₉ y linfocitos Th foliculares, entre otros. Según la actividad que desempeñan se agrupan en: relacionados por la inmunidad celular y proinflamación (Th₁, Th₉ y Th₁₇), y relacionados con la inmunidad humoral, (Th₂ y Th foliculares). Los Treg y Th₃ se encargan de fenómenos de supresión de la respuesta, importantes como elementos de control del sistema inmunitario (Day, 2011)

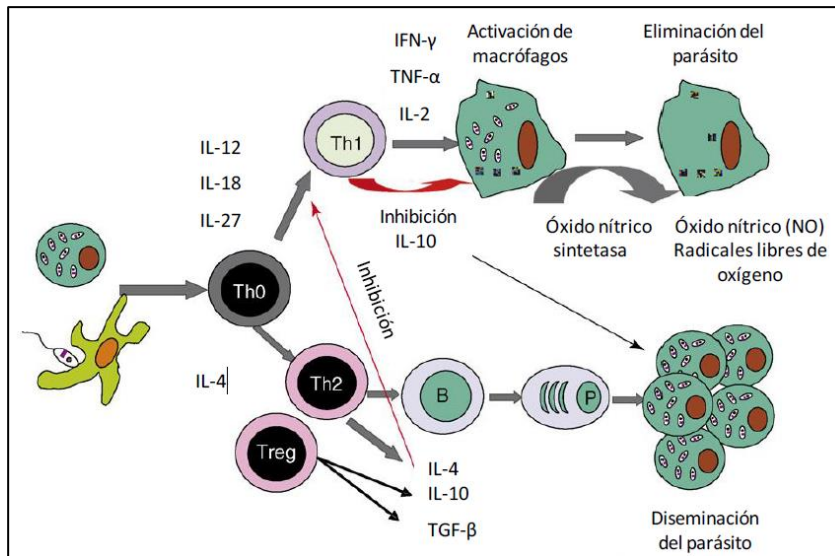


Figura 7. Respuesta inmunitaria regulada por linfocitos T. (Modificado de Baneth, 2008)

La respuesta inmunitaria celular, expresada por la mayoría de los perros infectados, se manifiesta por una fuerte proliferación linfocitaria in vitro (Maia y Campino, 2008). Sin embargo, la ineficiente inmunidad celular presente en estos animales lleva a una inflamación granulomatosa compensatoria y a una exacerbada inmunidad humoral, resultando en el depósito de inmunocomplejos en diferentes órganos y la generación elevada de anticuerpos no protectores (Koutinas y Koutinas 2014).

2.4.1.3.2 RESPUESTA INMUNITARIA DE BASE HUMORAL

La Lcan se asocia con una respuesta humoral marcada, existiendo una correlación positiva entre la concentración de anticuerpos IgG Leishmania-específicos, la carga parasitaria en los tejidos y el cuadro clínico en el animal (Boggiatto *et al.*, 2010). Además, se asocia también a concentraciones altas en sangre de IgA e IgM (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007).

Entender este tipo de respuesta inmune es muy importante para establecer un buen pronóstico y aplicar el mejor tratamiento posible.

La activación de los LB y la superproducción de inmunoglobulinas producen la formación de inmunocomplejos compuestos por inmunoglobulinas y por diferentes fracciones del complemento (Makni *et al.*, 1989). En perros enfermos, esta actividad es debida al agotamiento de los LT en órganos linfoides, siendo falsamente compensado por LB (Koutinas y Koutinas, 2014). La hipergammaglobulinemia asociada produce, directa e indirectamente, alteraciones patológicas mediante la generación de auto-anticuerpos dando lugar a una trombocitopenia inmunomediada. Además, se producen anticuerpos anti-histonas, afectando al tejido renal

produciendo glomerulonefritis e IC circulantes generando vasculitis, uveítis y poliartritis. (Cortese et al., 2009; Alvar et al., 2004; Ginel et al., 2008). Dichos IC solubles también reducen la actividad fagocítica de los macrófagos y aumentan la inflamación mediada por la activación del complemento (Saridomichelakis, 2009).

La linfadenomegalia generalizada, esplenomegalia e hiperglobulinemia, muy características en esta enfermedad, son debidas a los mecanismos explicados junto a la actividad de las células plasmáticas, histiocitos y macrófagos.

Por último, dentro de las IgG, se ha observado una asociación entre los subisotipos IgG₁ e IgG₂ con el tipo de respuesta Th y el cuadro clínico, pero no se ha alcanzado un consenso sobre si la respuesta inmune humoral está polarizada en la Lcan. Algunos autores describen una correlación negativa entre IgG₁ con la aparición de signos clínicos en animales infectados como describe Freitas *et al.*, (2012) en perros infectados de forma natural y, en cuanto a las concentraciones séricas de IgG₂, no observaron diferencias entre animales infectados clínicamente sanos y enfermos. Sin embargo, otros autores, hallaron niveles superiores de esta subclase en perros enfermos (Leandro *et al.*, 2001)

2.4.2 PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS

Los pilares de la patogenia de Lcan, son el resultado de una compensación ineficaz de una respuesta inmune celular frente al parásito que incluyen, de manera resumida: una marcada respuesta humoral, con el consiguiente depósito de inmunocomplejos en los órganos diana, y una reacción inflamatoria granulomatosa desmesurada (Koutinas y Koutinas, 2014). Dichos mecanismos son responsables del amplio abanico de signos clínicos y de la extensa distribución del parásito por el organismo en la Lcan, al contrario de lo que ocurre en personas con infección por *L. infantum*, donde el parásito se limita a invadir el hígado, bazo y médula ósea (Alvar *et al.*, 2004).

Como consecuencia de la continua estimulación antigénica, se produce una proliferación masiva de linfocitos B y células plasmáticas, con una masiva producción de anticuerpos, y la consiguiente linfadenomegalia e hiperglobulinemia. Las dos principales reacciones de hipersensibilidad descritas son la hipersensibilidad tipo II y tipo III. La primera se caracteriza por reacciones mediadas por la interacción de anticuerpos (mayoritariamente inmunoglobulinas tipo G y tipo M) con el antígeno presente en la superficie de las células y otros componentes tisulares. Sin embargo, la reacción de hipersensibilidad de tipo III se asocia con la formación de

inmunocomplejos circulantes que, al depositarse en los tejidos, provocan la activación de fagocitos y daño tisular.

Otro fenómeno descrito como consecuencia de esta producción masiva de inmunoglobulinas es el desarrollo de anticuerpos por parte de los perros enfermos, por lo que puede producirse el fenómeno de trombocitopenia inmunomediada (hipersensibilidad de tipo II) agravando así el cuadro clínico (Baneth y Solano-Gallego, 2012). En este punto, cabe destacar que no todas las lesiones que se producen en el transcurso de la enfermedad están mediadas por una reacción de hipersensibilidad, como en la inflamación piogranulomatosa o linfoplasmocitaria, que puede detectarse en órganos donde está presente el parásito. Por lo tanto, las lesiones observadas en la leishmaniosis se deben a numerosos mecanismos inmunopatológicos.

En resumen, en el cuadro histopatológico de la leishmaniosis canina en los numerosos tejidos y órganos afectados predomina desde una inflamación piogranulomatosa a granulomatosa y / o un daño inmunomediado debido a la deposición de inmunocomplejos o a la generación de autoanticuerpos (Ferrer, 2002).

La inflamación granulomatosa se caracteriza por un infiltrado y/o proliferación de macrófagos, histiocitos, linfocitos, células plasmáticas y en algunas ocasiones neutrófilos y eosinófilos, que afecta fundamentalmente a linfonodos, médula ósea, bazo, hígado, intestino, huesos, aparato genital masculino y mucosas (Saridomichelakis, 2009).

2.4.2.1 MECANISMOS PATOGENICOS EN LOS DIFERENTES TEJIDOS

Desde la piel, los parásitos se distribuyen por sangre o linfa a los linfonodos, al bazo y, posteriormente, a otros órganos como hígado y riñones. A continuación, los parásitos se pueden aislar en la totalidad del organismo en el perro (Alvar *et al.*, 2004).

-Linfonodos y bazo: Tanto la linfadenomegalia como la esplenomegalia son signos muy frecuentes detectados en esta enfermedad y son el resultado de una hiperplasia linfoide reactiva. En los linfonodos se produce una hipertrofia cortical y medular con abundantes macrófagos infectados, ocasionando dicha linfadenomegalia periférica (Lima *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008).

El bazo se considera un órgano clave para la supervivencia del parásito ya que su respuesta inmunitaria es ineficaz. (Lima *et al.*, 2007). La esplenomegalia es el resultado de una

proliferación y /o infiltración de monocitos y macrófagos y de la hiperplasia tanto de la pulpa blanca como de pulpa roja debida a los cambios en la microvasculatura (Tafari *et al.*, 2001).

-Médula ósea: Debido a que la médula ósea alberga gran cantidad de amastigotes se produce una inflamación granulomatosa que ocurre en paralelo con una hiperplasia linfoplasmocitaria, displasia o hipoplasia megacariocítica y eritrofagocitosis. Todo ello contribuye a una marcada anemia y trombocitopenia característica en perros afectados (Foglia *et al.*, 2006).

-Hígado: La hepatomegalia, causada por congestión pasiva y hepatitis crónica, es muy frecuente en la Lcan (Giunchetti *et al.*, 2008). Además de los macrófagos, también pueden aparecer células de Kupffer y hepatocitos infectados (Tafari *et al.*, 2001). Los animales enfermos presentan granulomas hepáticos desorganizados y son incapaces de eliminar a los parásitos (Sanchez *et al.*, 2004). Estos sufren alteraciones morfológicas, quedando afectado su metabolismo, lo que contribuye a muchas de las alteraciones clinicopatológicas de la Lcan, como hipoalbuminemia y aumento de la actividad enzimática en suero, pero raramente ocasiona fallo hepático funcional (Giunchetti *et al.*, 2008).

-Piel: Las manifestaciones clínicas cutáneas son muy comunes, estando presentes en aproximadamente el 80-90% de los casos de Lcan (Miró y Molina, 2006). Las más frecuentes son una dermatitis exfoliativa, dermatitis ulcerosa, onicogriposis y dermatitis papular. Estas lesiones normalmente se generan por una inflamación piogranulomatosa que afecta a diferentes estructuras de la piel, o bien, siendo menos frecuente, por la deposición de inmunocomplejos. (Saridomichelakis, 2009).

Otras manifestaciones menos comunes son: una dermatitis pustular, despigmentación nasal, hiperqueratosis nasodigital, paniculitis, eritema multiforme, entre otros. (Blavier *et al.*, 2001). La patogénesis de estas lesiones es contradictoria entre los diferentes autores, quizá debido a la poca casuística de las mismas.

-Lesiones oculares: Las prevalencias de lesiones oculares y perioculares descritas en la Lcan oscilan entre el 16% y 80,5%, pudiendo llegar a ser la única manifestación clínica en un 15% de los casos clínicos (Koutinas y Koutinas, 2014). La manifestación ocular más frecuente es la uveítis anterior, sin embargo, la uveítis posterior (que suele acompañar a la uveítis anterior) se diagnostica con menor frecuencia (Peña *et al.*, 2000).

Los mecanismos patogénicos según la lesión producida son: inflamación granulomatosa secundaria a la presencia del parásito, produciendo blefaritis, conjuntivitis primaria, inflamación de las glándulas lagrimales y depósito de IC, dando lugar a la uveítis (Koutinas y Koutinas, 2014)

-Lesión renal: Los trastornos renales son muy comunes en esta enfermedad y, en algunos casos, es la única manifestación de leishmaniosis. Estos pueden ser desde una proteinuria subclínica hasta el síndrome nefrítico y /o fallo renal, lo que es la principal causa de muerte de estos animales.

La patogénesis en este tejido se inicia por el depósito de inmunocomplejos circulantes debido a una estimulación antigénica en sangre constante produciendo una glomerulonefritis y la consiguiente enfermedad renal irreversible (Aresu *et al.*, 2013). Las alteraciones más frecuentes son la glomerulonefritis y la tubulonefritis, mientras que la amiloidosis es un hallazgo ocasional. De las diversas formas descritas de glomerulonefritis, las formas proliferativas difusas, membranosa y mesangial son las más frecuentes (Costa *et al.*, 2003; Zatelli *et al.*, 2003).

-Lesiones óseas y articulares: Se trata de lesiones frecuentes en perros infectados. A nivel óseo, se ha descrito osteomielitis granulomatosa secundaria a la distribución hemática de los parásitos y osteólisis. La patología articular se traduce en cojeras y poliartritis que puede ser bilateral y simétrica, tanto erosiva como no erosiva (Saridomichelakis, 2009). La patogenia de este tipo de lesión puede ser debida a la presencia de una elevada carga parasitaria provocando una sinovitis granulomatosa y por el depósito de IC en el líquido sinovial produciendo una reacción de hipersensibilidad tipo III que finalmente acaba atrayendo neutrófilos con la consiguiente destrucción articular mediante enzimas hidrolítica (Blavier *et al.*, 2001).

-Muscular: La atrofia muscular progresiva está asociada a polimiositis crónica caracterizada por la presencia de infiltrados mononucleares con amastigotes de *Leishmania*, vasculitis neutrofílica e IC en el tejido muscular junto con la producción de anticuerpos frente a fibras musculares. La musculatura más afectada por la atrofia progresiva es la facial (músculo temporal y masetero), sin afectar a la masticación. La polimiositis de músculos esqueléticos en Lcan afecta fundamentalmente a la musculatura apendicular ocasionando debilidad muscular progresiva, cojera e intolerancia al ejercicio. Dicha polimiositis suele ser subclínica, con tan sólo unos pocos casos descritos (Vamvakidis *et al.*, 2000; Paciello *et al.*, 2009).

-Epistaxis, hematuria y diarrea hemorrágica: Estas alteraciones están asociadas a la ulceración de tejidos y a cambios en la hemostasis primaria y secundaria. Los cambios hemostáticos descritos en la Lcan incluyen alteraciones en la agregación plaquetaria, que conduce a una disfunción plaquetaria, trombocitopenia, reducción en la fibrinólisis y factores de coagulación, probablemente debidas a la hepatitis crónica y fibrinólisis (Ciaramella *et al.*, 2005; Baneth *et al.*, 2008)

-Lesión cardíaca y respiratoria: A pesar de no haberse encontrado una relación clara entre la Lcan y la afección cardiorrespiratoria, se han observado infiltrados inflamatorios en corazón y pulmones en perros con leishmaniosis, tanto en presencia como en ausencia de amastigotes en los tejidos (Alves et al. 2010; Costagliola *et al.*, 2016)

-Lesión neurológica: El cuadro neurológico es poco frecuente. No obstante, la Lcan se asocia con una meningoencefalomielitis subyacente, que puede ser la responsable de varios signos neurológicos (convulsiones, dolor y rigidez de cuello, paraplegia) y suele ser consecuencia de meningitis granulomatosa y/o neutrofílica, granulomas en el sistema nervioso central, hemorragias medulares, vasculitis o infartos cerebrales (Font *et al.*, 2004; José-López *et al.*, 2012). El depósito intersticial e intravascular de IgG y antígenos de *Leishmania* encontrados en el plexo coroideo de animales infectados con *L. infantum* sugiere la alteración de las barreras de filtración sangrelíquido cefalorraquídeo y de los cuerpos ciliares están alteradas (García-Alonso *et al.*, 1996; Saridomichelakis, 2009).

-Reproductor: En el aparato reproductor masculino se ha descrito lesión inflamatoria de origen inmunomediado o infeccioso debido a la presencia del parásito, produciendo una orquitis, epididimitis y prostatitis. Todo ello de carácter crónico causando así una hematospermia-teratozoospermia y posiblemente, infertilidad. También se relaciona con la infección, una enfermedad granulomatosa del pene, y balanopostitis. Sin embargo, en el caso de la hembra no se han descrito procesos derivados de la infección sobre el sistema reproductor (Koutinas y Koutinas, 2014).

2.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Es necesario realizar el diagnóstico etiológico para confirmar la enfermedad clínica y determinar la presencia de infección en estudios de investigación, para la detección de los perros clínicamente sanos que viven en zonas endémicas, para prevenir la transmisión de portadores subclínicos mediante transfusión de sangre, evitar la importación de perros infectados en zonas no endémicas, y monitorizar la respuesta al tratamiento.

Se recomienda combinar el examen clínico-patológico con una confirmación laboratorial de la enfermedad. Para ello, se puede realizar un diagnóstico parasitológico, mediante la observación directa al microscopio de amastigotes, cultivo o PCR del parásito, o mediante serología, ya sea basada en anticuerpos (Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), ELISA, Aglutinación Directa (DAT), prueba rK39) o en antígenos (Chappuis *et al.*, 2007).

La aproximación diagnóstica más útil para investigar la infección en perros enfermos y sanos incluye, por un lado la observación mediante microscopio óptico, por otro lado, la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* mediante técnicas serológicas cuantitativas y, por último, detección de DNA de *Leishmania* en tejidos mediante técnicas moleculares. Es muy importante insistir en que la información obtenida mediante PCR no puede utilizarse de forma separada de los datos clínico-patológicos y los resultados de la serología. Toda esta información debe interpretarse de manera conjunta para llegar a una evaluación completa, exhaustiva y correcta de cada caso (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

2.5.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El diagnóstico de la leishmaniosis clínica es complejo por lo que es importante conocer la historia clínica, realizar un examen físico completo que incluya, a ser posible, un examen dermatológico y oftalmológico, y pruebas de laboratorio de rutina, como hemograma, bioquímica, urianálisis y radiografías o ecografías, que pueden ayudarnos a aumentar el índice de sospecha de esta enfermedad (Baneth y Solano-Gallego, 2012).

2.5.1.1 CUADRO CLÍNICO

El cuadro clínico en esta enfermedad puede ser muy diverso, consecuencia de los numerosos mecanismo patogénicos existentes en la enfermedad, los diferentes órganos afectados, así como la individualidad de la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador (Baneth *et al.*, 2008).

La linfadenomegalia periférica y las lesiones cutáneas (especialmente dermatitis exfoliativa), están presentes en la mayoría de los animales que padece la enfermedad (Noli y Saridomichelakis, 2014) pudiendo llegar a ser las únicas manifestaciones presentes en leishmaniosis canina. También se puede observar pérdida de peso intolerancia al ejercicio, astenia, atrofia muscular, poliuria/polidipsia, esplenomegalia, lesiones oculares, vómitos y diarreas, artritis y cojeras (Solano Gallego *et al.*, 2009). En estados muy avanzados el animal presenta caquexia y puede llegar a morir como consecuencia de la enfermedad renal.

En conclusión, y dada la enorme variabilidad de los signos clínicos citados, en zonas endémicas la observación de uno sólo de los signos clínicos señalados debería ser motivo suficiente para incluir la leishmaniosis en el diagnóstico diferencial (Miró y Molina, 2006).

2.5.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

2.5.2.1 DETECCIÓN AMASTIGOTES POR CITOLOGÍA

Se puede realizar un diagnóstico concluyente mediante observación directa al microscopio de los amastigotes de *Leishmania* en frotis teñidos de órganos y tejidos infectados, como médula ósea, linfonodos, piel o sangre periférica. Las tinciones empleadas son métodos metacromáticos convencionales como Giemsa, May-Grunwald, Diff-Quick. Los amastigotes se observan en el interior del citoplasma de monocitos, neutrófilos o principalmente de macrófagos o libres (Maia y Campino, 2008). El principal problema es que la mayoría de estas muestras se obtienen a través de procedimientos invasivos que, generalmente, no son útiles para detectar al parásito en perros asintomáticos (Alvar *et al.*, 2004)

2.5.2.2 HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

El análisis histopatológico de órganos infectados teñidos con Hematoxilina-Eosina (HE) también se han empleado para detectar la presencia del parásito, aunque se requiere bastante tiempo para poder identificar el amastigote mediante esta técnica (Xavier *et al.*, 2006).

La inmunohistoquímica (IHQ) es una herramienta que se basa en la detección del antígeno de *Leishmania* utilizando, como anticuerpos primarios, anticuerpos procedentes del suero de un perro infectado (suero hiperinmunizado) o anticuerpos monoclonales o policlonales. Se trata de una técnica complementaria a la HE, bastante sensible y específica. (Tafari *et al.*, 2004).

2.5.2.3 CULTIVO EN MEDIO ESPECÍFICO

La principal aplicación de esta técnica es el aislamiento de la especie responsable de la infección, así como de la posterior especiación, identificación de la cepa o la evaluación in vitro de nuevos fármacos con capacidad leishmanicida (Maia y Campino, 2008)

El cultivo in vitro de diferentes tejidos puede mejorar la detección del parásito. No todas las cepas de *Leishmania* crecen en los mismos medios, y no todos los tejidos y órganos del mismo perro tienen una carga parasitaria similar.

Existen medios de cultivo monofásicos como el Schneider's *Drosophila* o RPMI, comercialmente disponibles, pero poco efectivos para el aislamiento del parásito (Castillo *et al.*, 1983; Gramiccia, 2011). El medio de cultivo más idóneo es el NNN pero no está comercializado. Este medio consta

de una mezcla de agar-sangre de conejo al 15% con una fase líquida proveniente del agua de condensación originada al solidificarse el medio. Un cultivo se considera negativo si no se observan promastigotes tras cuatro pases sucesivos (Maia y Campino, 2008).

2.5.3 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

De manera habitual, el diagnóstico de la leishmaniosis canina se realiza mediante la detección de anticuerpo específicos contra el parásito en suero donde, además, las concentraciones de anticuerpos anti-leishmania específicos se correlacionan con la parasitemia y con el estado clínico del animal (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007)

2.5.3.1 MÉTODOS CUANTITATIVOS

Existen diversas pruebas serológicas para el diagnóstico de la leishmaniosis, pero las más utilizadas son, la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el test de aglutinación directa (DAT) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La sensibilidad y la especificidad de cada una de ellas no dependen únicamente de las características inherentes a la propia técnica, sino, en gran medida, del antígeno utilizado.

2.5.3.1.1 INUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

La IFI se ha considerado como el método de referencia para el diagnóstico serológico debido a su alta especificidad y sensibilidad (Maia y Campino, 2008) para la detección de leishmaniosis clínica, pero parece ser menos sensible en la detección de perros sanos infectados. En esta técnica se emplea el cuerpo entero del parásito (promastigote) como antígeno por lo que es muy útil en estudios epidemiológicos, en la clínica y en el seguimiento del tratamiento (Alvar *et al.*, 2004)

La limitación de IFI es la subjetividad en la lectura, la poca idoneidad de la técnica para estudios epidemiológicos, debido al gran número de muestras que se deben analizar en estos casos, y la existencia de diferentes criterios para establecer el límite de positividad de la muestra relacionado a menudo con los diferentes aislamientos de *Leishmania* utilizados (Cabral *et al.*, 1998) sumado a la necesidad de un microscopio de fluorescencia.

Debido a que muchos laboratorios han establecido el punto de corte de forma arbitraria, es posible encontrar diferentes titulaciones a la hora de considerar positivo a un animal, desde 1:40 a 1:80 e incluso 1:160 (Gramiccia 2011).

2.5.3.1.2 TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN DIRECTA (DAT)

Se trata de una técnica serológica cuantitativa cuyo principio es el fenómeno de aglutinación en el que los anticuerpos del suero del animal reaccionan de manera específica con el antígeno. Se puede utilizar tanto en suero como en sangre entera. Se considera un resultado positivo cuando es visible el fenómeno de aglutinación. Esta se observa a simple vista en forma de esfera o botón agrandado en el fondo del pocillo (Gómez-Ochoa et al., 2003).

En esta técnica se emplean promastigotes completos y teñidos, bien en suspensión o en forma liofilizada. Es barata y fácil de realizar, lo que la convierte en ideal tanto para uso laboratorio como de campo. Una de las limitaciones de DAT es que el periodo de incubación necesario para la lectura de los resultados es relativamente largo y que hay que hacer diluciones seriadas de los sueros o sangres, por lo que es laborioso y poco adecuado cuando se trabajan con grandes volúmenes de muestras (Harith *et al.*, 1989).

2.5.3.1.3 ELISA

El fundamento de esta técnica consiste en evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo en el suero de los animales infectados por medio de una enzima que transforma un sustrato en un producto cuantificable mediante espectrofotometría.

La sensibilidad y especificidad de ELISA depende de los antígenos utilizados, que pueden clasificarse en cuatro grupos según su naturaleza: extractos de promastigotes solubles o completos, proteínas recombinantes y proteínas purificadas (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

La técnica ELISA es útil tanto para análisis en laboratorios como para su uso en el campo y permite trabajar con un gran número de muestras en poco tiempo, ya que su realización es bastante sencilla y se puede aplicar con varios tipos de antígenos. Además, a diferencia de la IFI y el DAT, tiene la ventaja de ser un método objetivo de lectura espectrofotométrica, fácilmente automatizable.

2.5.3.1.4 OTRAS TÉCNICAS

-Western Blot: Esta técnica se basa en la detección de anticuerpos frente a fracciones antigénicas específicas del parásito. Se ha empleado para evaluar la fase de la infección en la que se encuentra el animal y la respuesta al tratamiento. Posee una sensibilidad superior a la de la técnica de IFI y es capaz de discriminar fases tempranas de la enfermedad en animales con resultados negativos mediante IFI y ELISA. Sin embargo, no se realiza rutinariamente en el

diagnóstico de la Lcan ya que requiere personal especializado y un laboratorio de investigación, siendo su aplicación principal validar otras técnicas

-Citometría de flujo: Se trata de una técnica rápida y precisa que permite cuantificar, examinar y clasificar partículas microscópicas suspendidas en una corriente de fluido, como IgG frente a promastigotes de *Leishmania*. Posee alta sensibilidad y especificidad y ha demostrado su utilidad en el diagnóstico de animales vacunados, infectados y no infectados.(Solano-Galllego y Villanueva, 2013)

2.5.3.1 MÉTODOS CUALITATIVOS

Existen diversos análisis inmunocromatográficos que permiten dar un resultado cualitativo muy rápido y fáciles de usar. Cada uno difiere en el antígeno y reactivo empleado (Paltrinieri *et al.*, 2010). Fundamentalmente se basan en el antígeno rK39, disponible en el mercado en la forma de tiras de papel de nitrocelulosa impregnadas del antígeno. A pesar de presentar una especificidad media-alta, su sensibilidad es muy variable, lo que incrementa el número de resultados falsos negativos al ser incapaces de detectar perros con niveles bajos de anticuerpos. En cambio, algunos autores encuentran una sensibilidad alta con algunos de estos kits comerciales, como es el caso del SNAP® Canine Leishmania Antibody Test Kit (IDDEX) y el rK39 dipstick, (94,7% y 97,06%, respectivamente)(Marcondes *et al.*, 2011). En resumen, se encuentra una buena especificidad pero variable sensibilidad, además, su desarrollo todavía no es del todo óptimo.

2.5.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

2.5.4.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los métodos basados en la PCR son los más fiables para la detección y la identificación del parásito, no solo en animales con la enfermedad activa, sino también en aquellos que están en tratamiento, en los que permite monitorizar la curación parasitológica, ya que amplifican específicamente un fragmento del organismo en cuestión.

En esta técnica se amplifican fragmentos de DNA del quinetooplasto, que aparecen repetidos en múltiples copias en el parásito, alcanzando una sensibilidad del 95%-100%. (Moreira *et al.* 2007).

La PCR de *Leishmania* se puede realizar por extracción de DNA de diferentes tejidos, sangre, fluidos biológicos e incluso material histológico. La médula ósea, ganglios linfáticos, bazo o piel son los tejidos más sensibles para el diagnóstico mediante PCR (Maia y Campino, 2008; Manna *et*

al., 2008). La obtención de muestras no invasivas de hisopos conjuntivales parece tener una elevada sensibilidad para la detección de *L. infatum* en grupos de perros seropositivos con leishmaniosis clínicas (Strauss-Ayali *et al.*, 2004).

A pesar de su alta fiabilidad, se debe tener en cuenta que un resultado negativo de PCR en un perro clínicamente sospechoso no es suficiente para descartar la infección. El amplio rango de sensibilidad que se observan en los diferentes estudios se podría explicar por la heterogeneidad de la distribución del parásito en cada tejido o por la carga parasitaria del órgano estudiado, que debe asociarse también al tropismo de la cepa de *Leishmania* y a la respuesta inmunitaria local del hospedador.

Además, la eficacia de la técnica de PCR depende de otros muchos factores, como los cebadores seleccionados, el número de copias realizadas, el método de extracción del DNA, el material de muestra a analizar y el protocolo que se sigue de la técnica (Alvar *et al.*, 2004; Baneth y Aroch, 2008)

2.5.4.1.1 PCR A TIEMPO REAL (qPCR)

La qPCR es un método cuantitativo que permite la monitorización continuada de las secuencias amplificadas de DNA específicas conforme sucede la reacción. Esto permite la cuantificación exacta del DNA presente al principio de la reacción y, a partir de esta, una estimación de la carga parasitaria relativa de las diferentes muestras biológicas empleadas.

Las ventajas que presenta la qPCR con respecto a la PCR convencional son el aumento de la sensibilidad, reducción del tiempo de la prueba, menor riesgo de contaminación, y la utilidad en la monitorización de la carga parasitaria del animal durante la infección y el tratamiento (Rodríguez- Cortés *et al.*, 2007).

En consecuencia, la PCR cuantitativa es muy útil para el diagnóstico de la leishmaniosis canina ya que facilita la monitorización de la carga parasitaria del animal infectado durante y después del tratamiento en diferentes tipos de muestras, lo que permite predecir la reaparición de la infección asociada a las cargas residuales del parásito en los tejidos tras el tratamiento (Francino *et al.*, 2006). Además en los últimos años, mediante esta técnica se están valorando nuevos tejidos cuya obtención es menos invasiva como el pelo, orina e hisopado vulvar, conjuntival y oral para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad (Carvalho *et al.*, 2014; Hernandez *et al.*, 2015).

2.5.5 DETECCIÓN DE RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR

Como se ha explicado anteriormente, la respuesta inmunitaria celular se asocia a un perfil inmunológico similar al tipo Th₁, caracterizado por la producción de citoquinas como IFN- γ , IL-2 y TNF- α . Las principales pruebas de estudio de esta inmunidad se pueden dividir en métodos *in vivo* (test de hipersensibilidad retardada) y métodos *ex vivo* (estudio de linfoproliferación y detección de IFN- γ). Este tipo de técnicas se encuentran poco estandarizadas y su uso se restringe casi exclusivamente a la investigación

Respecto al test de hipersensibilidad retardada o test de Montenegro de leishmania (LST), consiste en valorar la respuesta celular *in vivo* tras la inoculación intradérmica de promastigotes inactivados. Refleja la presencia de respuesta inmunitaria de células específicas frente a leishmania.

Por otro lado la técnica de linfoproliferación (LPL) Consiste en el cultivo de linfocitos, principalmente de sangre periférica, con antígenos del parásito para valorar su capacidad blastogénica y se añade un mitógeno inespecífico para valorar la inmunocompetencia del individuo. Las células no estimuladas también se cultivan como controles negativos. Se trata de una técnica laboriosa, que requiere equipamiento especializado y es poco sensible (60-75%) y específica (83%). La respuesta linfoproliferativa específica no sólo depende de la gravedad de la enfermedad, sino también de la genética y el estatus inmunológico del hospedador (Maia y Campino, 2008).

Por último, la detección del interferón gamma. Se trata de la citoquina más importante involucrada en la respuesta celular frente al parásito, producido por linfocitos circulantes estimulados con el antígeno de *Leishmania* en sobrenadantes cultivados. Este bioensayo valora la protección que el IFN- γ infiere a una monocapa de células renales caninas infectadas con el virus de la estomatitis vesicular (Fernández-Bellon *et al.*, 2005). El IFN- γ representa un buen marcador para predecir recaídas de la enfermedad en perros infectados y para determinar la eficacia del tratamiento (Manna *et al.*, 2008) Las grandes desventajas de esta técnica son que es muy laboriosa y que emplea un virus altamente patógeno.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS

El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de la inmunopatogénesis de la leishmaniosis visceral canina en órganos, en los cuales los estudios realizados hasta el momento son escasos, como son el muscular y el reproductor. También se pretende valorar el potencial de la proteína lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) como biomarcador precoz de fallo renal en leishmaniosis y su posible asociación con la localización, características e intensidad de las lesiones.

El trabajo se dividió en tres ensayos:

1. En el primero, se realizó un estudio general de la población para valorar el estado de los animales tras la infección experimental, tanto su estado clínico, serológico y parasitológico.
2. En el segundo se seleccionaron los tejidos referidos en concreto, el músculo temporal, por ser asiento frecuente de lesiones caracterizadas principalmente por atrofia, y por otro lado, el aparato reproductor masculino, de vital importancia en la posible transmisión del parásito, así como en la función reproductiva del perro infectado por *Leishmania*.
3. En el tercer ensayo se estudiaron las lesiones renales ya que son de vital importancia para poder valorar el pronóstico del animal. En este punto, se valoró una proteína (NGAL) como biomarcador precoz de daño renal, lo que facilitaría el tratamiento y supervivencia del paciente ya que los utilizados de manera rutinaria en laboratorio detectan la pérdida de funcionalidad del mismo en estados muy avanzados. Además se relacionó con el tipo y grado lesional valorado por histología.

Para lograr los objetivos planteados y para el mejor entendimiento del mismo, la metodología se divide en tres apartados. En primer lugar se describe la metodología común para ambos estudios (características de los animales y técnicas de experimentación) y, a continuación la específica para cada estudio.

3.2 METODOLOGÍA GENERAL

3.2.1 ANIMALES

3.2.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para el presente trabajo se utilizaron 58 animales de la subespecie *Canis lupus familiaris* Linnaeus 1758, de la raza Beagle pertenecientes a un estudio patrocinado por la empresa CZ Veterinaria S.A. y realizado en el departamento de Patología Animal de la Universidad de Zaragoza.

Los animales procedentes de un criadero autorizado de acuerdo a la legislación vigente (RD53/2013) localizado en una zona libre de leishmaniosis (CEDS, Les Souches, 89130 Mezilles, Francia), fueron vacunados y desparasitados adecuadamente.

Todos ellos fueron infectados experimentalmente con 1×10^8 promastigotes de *L. infantum* vehiculados en solución salina estéril, excepto tres animales que se utilizaron como grupo control negativo. Un año después de la infección experimental (365 días post-infección), tiempo considerado como adecuado para que los animales desarrollen la enfermedad, se estableció el punto final del estudio y se procedió al examen clínico y la toma de muestras para el desarrollo de los diferentes ensayos. Posteriormente, se procedió a la eutanasia de los animales y se realizó su necropsia para la obtención de las muestras necesarias de los tejidos a estudio.

De los animales, 31 individuos son machos y 26 hembras, de una edad aproximada de 18 meses. Una de las hembras (D: 16) se excluyó del estudio porque no fue sacrificada en el mismo tiempo post infección que el resto por motivos ajenos al estudio. Así pues, se trabajó con un total de 57 animales.

3.2.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron del estudio aquellos perros que resultaron positivos a *Leishmania* y/o *Ehrlichia canis* a la llegada a las instalaciones del SEA (Servicio de Experimentación Animal) de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. También fueron excluidos los animales que, durante el estudio, mostraron algún signo de enfermedad no relacionada con la infección por *Leishmania* o que requirieron del uso de ciertos medicamentos como corticoesteroides.

Los animales se mantuvieron de acuerdo a las disposiciones del Anexo II del RD 53/2013 y se dispusieron en cheniles, en grupos de cinco, estando todos ellos identificados con microchip. El alojamiento, condiciones de enriquecimiento animal, manejo de los animales y alimentación se realizó de acuerdo a los requisitos etológicos de la especie en cuestión y, fue llevado a cabo por el personal de SEA de la Facultad de Veterinaria. La realización de las técnicas de experimentación sobre los animales fue llevada a cabo por personal veterinario cualificado y acreditado con el curso de “Formación de personal responsable de dirigir y diseñar los procedimientos con animales de experimentación, categoría C”. Todo ello con el permiso correspondiente de la Comisión ética Asesora.

3.2.2 INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Tras el periodo de adaptación, se procedió a la infección experimental de todos los animales, exceptuando tres de ellos (un macho y dos hembras) que formaron el grupo control negativo.

3.2.2.1 CULTIVO INVITRO DE PROMASTIGOTES

Para la realización de la infección experimental se partió de promastigotes en medio de cultivo in vitro.

El material biológico se consiguió a partir del aislamiento de *Leishmania infantum* de bazo de un perro enfermo infectado de forma natural. La siembra se realizó en tubos con medio semisólido bifásico de agar sangre llamado NNN (Novy-Nicolle-McNeal), utilizando un macerado de la pulpa esplénica. El medio fue preparado en el laboratorio a partir de una mezcla de sangre de conejo desfibrinada, agar bacteriológico al 15% y antibiótico estreptomina penicilina para evitar contaminaciones. Se inocularon en el medio 2 o 3 gotas de macerado de la pulpa esplénica y se incubaron a una temperatura de 26°C. A los tres días y tras la confirmación de la presencia de promastigotes se hizo una resiembra en tubos de vidrio de 15 mL con NNN nuevamente para activar el crecimiento de los mismos (Figura 8).



Figura 8 Foto de tubos de vidrio con medio NNN para el cultivo *in vitro* de promastigotes.

Una vez realizado el aislamiento, aproximadamente en una semana, se pasó a flask de 30 mL en un medio RPMI 1640 enriquecido con L-glutamina y NaHCO_3 (SIGMA U.K.). Se añadió suero fetal bovino (Sigma-Aldrich, St. Luis Mo), al 10% (v/v) inactivado por calor y una mezcla antibiótica (penicilina 100UI/mL y estreptomycin 100 $\mu\text{g/mL}$) para evitar las contaminaciones bacterianas. Finalmente se procedió al filtrado a través de membranas con un diámetro de poro de 0,22 μm .

Para la infección experimental nunca se realizaron más de tres pases, evitando así la pérdida de la capacidad infectiva del protozoo.

3.2.2.2 REALIZACIÓN DE LA INFECCIÓN

El inóculo se obtuvo mediante centrifugación y lavado del cultivo usando Solución Salina Fisiológica (B. BRAUN, Medical S.A., Barcelona.), ajustándose la concentración en una cámara de recuento de Neubauer a mil millones de promastigotes por mililitro (1×10^8 promastigotes/mL). Se cargó el inóculo en una jeringuilla de 1 mL y se inyectó, tras desinfectar la zona, medio mililitro en cada vena cefálica.

3.2.3 EXAMEN CLÍNICO

Todos los animales se valoraron clínicamente para determinar la presencia de signos clínicos asociados a la infección experimental con *L. infantum*. Los síntomas a valorar (basándonos en los estudios de Manna (2009) con modificaciones realizadas en el grupo de investigación de Enfermedades Metaxénicas) fueron los siguientes: mucosas anémicas, conjuntivitis, uveítis, linfadenomegalia, atrofia muscular de músculos cefálicos temporales, lesiones cutáneas (alopecias, úlceras, hiperqueratosis, onicopriposis y dermatitis exfoliativa), esplenomegalia y hepatomegalia. Junto a estos exámenes clínicos se registró el peso corporal. Para cada animal se

asignó una puntuación clínica (PC) obtenida como la suma de cada síntoma individual empleando el esquema de puntuaciones descrito por dichos autores que se observa en la Tabla 3. Siendo 12 la puntuación máxima y 0 la mínima.

Tabla 3. Descripción de los signos clínicos establecidos en la exploración clínica para calcular la puntuación clínica de cada paciente.

Signos clínicos	Gradación
Pérdida de peso:	0= 0% de pérdida, 1= <20% 2=>20%
Síntomas oculares (conjuntivitis / uveítis)	0=ausencia, 1=moderada, 2=grave
Síntomas cutáneos: alopecias/úlceras	0=ausente, 1=moderada, 2=grave
Linfadenopatía	0=ausencia, 1=presencia
Mucosas anémicas	0=ausencia, 1=presencia
Onicogriposis	0=ausencia, 1=presencia
Atrofia del músculo temporal	0=ausencia, 1=presencia
Esplenomegalia a la palpación	0=ausencia, 1=presencia
Otros (cualquier otro síntoma relacionado con la infección)	0=ausencia, 1=presencia

Una vez registrados todos los signos clínicos se hicieron tres grupos de animales en función de la cantidad de signos expresados (según la modificaciones de Molina *et al.* (1994).

- Asintomáticos: Ausencia de síntomas y signos clínicos debidos a la infección por *Leishmania*. En este grupo se descartó el aumento de tamaño moderado de linfonodos, así como casos de mucosas anémicas.
- Oligosintomáticos: Síntomas moderados, incluyendo dos signos de infección, aumento de tamaño de los linfonodos junto con onicogriposis o alopecia /dermatitis exfoliativa.
- Polisintomáticos: Síntomas evidentes, incluyendo 3 o más signos de enfermedad.

Además, se hizo una tercera clasificación que consistió en agrupar a los animales en clínicos o subclínicos, coincidiendo los subclínicos con el Grupo 1 de la clasificación anterior y clínicos con Grupos 2 y 3.

3.2.4 EUTANASIA DE LOS ANIMALES Y RECOGIDA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Tras 365 días de la infección experimental, tiempo considerado suficiente para la aparición de signos clínicos, se procedió al sacrificio de los animales no sin antes registrar la clínica y extraer

las muestras de suero y orina. Se realizó por personal veterinario especializado y adecuadamente entrenado, empleando técnicas humanitarias de acuerdo al RD 53/2013. En este caso, se utilizó la solución inyectable T61 (Intervet) a una dosis de 0,3 mL/kg, previa sedación profunda con Hidrocloruro de Medetomidina (Laboratorios Calier S.A.), con una inyección intramuscular de 20-100 µg/kg de peso.

3.2.4.1 SUERO

Se realizó extracción de 2 mL de sangre mediante punción en vena cefálica que se recolectó en tubos sin anticoagulante con gránulos inertes para la rápida retracción del coágulo y se dejaron 4 horas a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron 10 minutos a 1.000 xg para la obtención de los sueros. Se almacenaron a -21°C hasta el procesamiento de los mismos.

3.2.4.2 TEJIDOS

Para la obtención de los tejidos a estudio (riñón, testículo y epidídimo, músculo temporal, linfonodos y médula ósea) se realizó cada necropsia de forma sistemática y completa. Las muestras se tomaron por duplicado con material desechable y se almacenaron una parte a -80°C para el estudio molecular de los tejidos y otra se conservó 24-48 horas en una solución con formaldehído tamponado al 10% que, posteriormente se incluyó en parafina para la realización del estudio histopatológico.

3.2.5 TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

Con el fin de valorar la presencia de anticuerpos en los animales frente a *Leishmania infantum*, así como el estado parasitológico (carga parasitaria) se realizaron dos técnicas serológicas, Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA por un lado y una PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de DNA parasitario en los tejidos diana: linfonodo y médula ósea.

A continuación se describe la metodología desarrollada en nuestro estudio para la realización de las técnicas de diagnóstico serológico y molecular.

3.2.5.1 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

3.2.5.1.1 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

- Preparación del antígeno

Para la realización del antígeno se partió de los cultivo in-vitro de promastigotes descrito anteriormente. Una vez alcanzaron la forma deseada (alargados, móviles y sin contaminación), y encontrándose el cultivo en fase de multiplicación exponencial, se procedió al lavado de los mismos. Para ello, se centrifugaron a 1350xg, a 4° C durante 15 minutos y el sedimento resultante se resuspendió en PBS para repetir este proceso tres veces más. Finalmente, se resuspendió el pellet de nuevo en PBS para pasar al conteo y ajuste de la concentración de promastigotes. Para ello se utilizó la cámara de Neubauer y se ajustó a 2×10^6 promastigotes/mL resuspendido en PBS y formol a 2%.

- Antigenado de placas

En primer lugar, se antigenaron placas de diez pocillos cada una, depositando 10 µL de la dilución formolada de promastigotes en cada uno. Las placas se secaron durante una hora a 37°C, protegidas del polvo y de la luz solar, en una estufa de cultivo y, posteriormente, se introdujeron en acetona a -20°C durante 10 minutos dejándose secar a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió al lavado de las placas con PBS (pH 7,2) durante otros 10 minutos, en agitación suave, y una vez secas, se almacenaron a -20°C, en oscuridad, hasta su utilización.

- Realización de la técnica

Antes de empezar la técnica se dejaron descongelar las placas a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos. A continuación, se realizaron diluciones seriadas dobles de los sueros, comenzando por la dilución 1:20 hasta la 1:1280 y se depositaron 10 µL de cada una de ellas en los pocillos. Además, se utilizaron un pocillo control positivo (de suero positivo a *Leishmania infantum*) y otro negativo por cada placa para así aumentar la fiabilidad de la técnica. Las placas se incubaron media hora a 37°C en cámara húmeda y, a continuación, se lavaron tres veces en agitación suave en PBS durante 10 minutos. Seguidamente, sobre los pocillos todavía húmedos se añadió la cantidad de otros 10 µL de una dilución 1/150 del anticuerpo conjugado Anti IgG de perro marcado con isotiocinato de fluoresceína-FITC (BIORAD Ref: AAI32F) diluido en azul de Evans al 0,2% en PBS. Las placas fueron incubadas de nuevo en cámara húmeda a 37°C

durante 30 minutos. A continuación se realizaron tres lavados en oscuridad de 10 minutos cada uno, dos en PBS y uno en agua destilada, y se dejaron secar. Por último, las placas se montaron con Fluoromount Medium (Sigma Ref: F4630) y se depositó encima un cubreobjetos de 22x60 mm.

Las placas fueron observadas al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i) con un objetivo de 40 aumentos. Un pocillo se consideró positivo en caso de observar un halo de fluorescencia verde completo y definido alrededor de la membrana de, como mínimo, el 80% de los promastigotes en cada campo de observación. En el caso de observar los promastigotes rojos o con una fluorescencia periférica incompleta o exclusivamente apical el pocillo se consideró negativo. Se acordó que la titulación igual o superior a 1:40 se considerara como suero positivo (Figura 9).

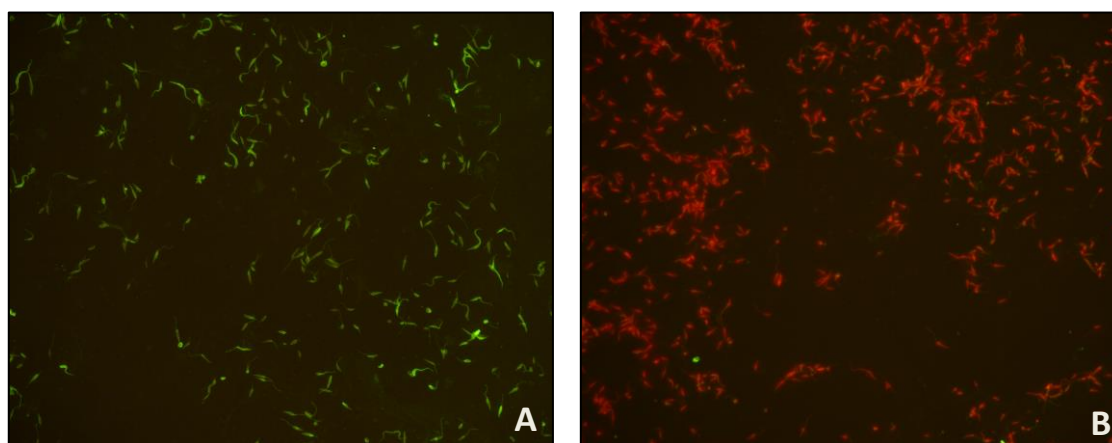


Figura 9. Reacción de inmunofluorescencia indirecta frente a *L. infantum* positiva (A) y negativa (B).

Una vez obtenidos todos los resultados se agruparon los animales según la titulación de anticuerpos obtenida:

- Negativo IFI < 1/40
- Positivo IFI 1/40- 1/160
- Positivo alto IFI > 1/160

3.2.5.1.2 ELISA

Para la realización de esta técnica se utilizó el kit de Elisa comercial CIVTEST Canis Leishmania 192 (HIPRA S.A. Lote: CLG.90XM) y se siguieron las pautas indicadas en el mismo.

Para su lectura, se realizó una medida de la absorbancia como densidad óptica (DO) mediante un lector de ELISA (Multiscan RC 6.0, Labsystems) a 405 nm. Las muestras de suero se analizaron por

duplicado y el valor medio de DO se convirtió en un porcentaje relativo siguiendo la siguiente fórmula.

$$\%RIPC = \frac{DO \text{ muestra} - DO \text{ control negativo}}{DO \text{ control positivo} - DO \text{ control negativo}} \times 100$$

Se consideraron positivos todos los sueros que se encontraron por encima del valor 0,9.

Una vez obtenidos todos los resultados se agruparon los animales según el porcentaje relativo de anticuerpo obtenido:

- Negativo ELISA <0,9
- Positivo ELISA 0,9 - 4
- Positivo alto ELISA >4

3.2.5.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

3.2.5.2.1 PCR A TIEMPO REAL (qPCR)

- Extracción de DNA

En primer lugar, para la valoración de la carga parasitaria en tejidos diana, se procedió a la extracción de DNA de las muestras de cultivo de promastigotes, linfonodo y médula ósea, mediante el kit comercial demo BIO UltraClean BloodSpin DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Ref. 12200-250), siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial, aunque con algunas modificaciones.

Siguiendo el manual de instrucciones, para la extracción de medio de cultivo se partió de 200 µL del mismo y se incubó junto con 25 µL de proteinasa K y 200 µL de tampón de lisis a 65°C, durante 30 minutos. Tras realizar tres lavados con diferentes tampones, el sedimento de DNA resultante fue resuspendido en 200 µL de tampón de elución. En cada serie de muestras se incluyó un control negativo de extracción que contenía todos los reactivos excepto la muestra de DNA para así poder detectar posibles contaminaciones durante el proceso.

En el caso de las muestras de linfonodo y médula ósea, se incubaron 25 mg de tejido junto con 200 µL de agua libre de DNAasas, 200 µL de tampón de lisis y 25 µL de proteinasa K, durante 1 hora a 65°C. A continuación se realizó una serie de lavados como en las muestras de promastigotes de cultivo para, finalmente, obtener una solución de 200 µL con el DNA en suspensión.

- Optimización de la PCR cuantitativa

La técnica desarrollada y puesta a punto en nuestro laboratorio se trata de una PCR cuantitativa basada en la detección de un fragmento específico de DNA de *Leishmania infantum* sobre el minicírculo del kinetoplasto (kDNA) y basada en la descrita por ALQUIZ Vetek SL. Para ello, se utilizó la sonda Taq Man (5'- FAMCAACCACCACCATCAAATCC- 3' IABkFQ) y un par de cebadores específicos (5'- CAAACCTATGCTCACTATC -3' y 5' GGTATGGGTATTCTTTATGG- -3'). El programa de amplificación consistió en una incubación inicial de 2 min a 50°C, seguido por 10 min de desnaturalización a 95 °C, y 40 ciclos a 95°C durante 15 s y 55°C durante 1 min cada uno. En la placa de reacción se incluyó una réplica de un control positivo del proceso elaborado a partir de promastigotes de *L. infantum* procedentes de cultivo para confirmar la repetitividad de la técnica y comprobar que las condiciones de amplificación habían sido las adecuadas. Además, se añadió un control negativo con agua libre de DNAasas (Promega Ref: P119E) en cada placa para corroborar la ausencia de contaminación durante la manipulación de las muestras. Cada muestra se analizó por duplicado.

En base a las condiciones óptimas de amplificación descritas por otros autores, se decidió llevar a cabo cada reacción en un volumen final de 20 µL. Para la detección de DNA de *L. infantum*, las concentraciones de los cebadores empleados en este estudio se ajustaron a 0,4 µmol l⁻¹ por cada uno de ellos y a 0,3 µmol l⁻¹ por la sonda, y el volumen de muestra de ADN ascendió a 2,5 µL.

Como soporte de la reacción se utilizaron placas de PCR de 48 pocillos (low 48-well Clear, Bio-Rad, Ref: 012250). Todas las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador MiniOpticon™ System (BIORAD). Los resultados obtenidos fueron analizados usando el programa Bio-Rad CFX Manager, versión 2.1.

Para el cálculo de la carga parasitaria de las muestras se procedió a la realización de la curva estándar con muestras de promastigotes de cultivo puro. Esta se realizó a partir de diluciones logarítmicas de una muestra de DNA de promastigotes de concentración conocida procedente de cultivo y previamente cuantificada mediante cámara de Neubauer. Para ello, se partió de una concentración de 2×10^7 promastigotes por mL de cultivo. La ecuación lineal resultante de la curva estándar permitió definir la eficiencia de amplificación E=104,4% y el coeficiente de determinación R²: 0,996 (Figura 10). Los resultados de carga parasitaria se expresaron como número de parásitos por mg de tejido.

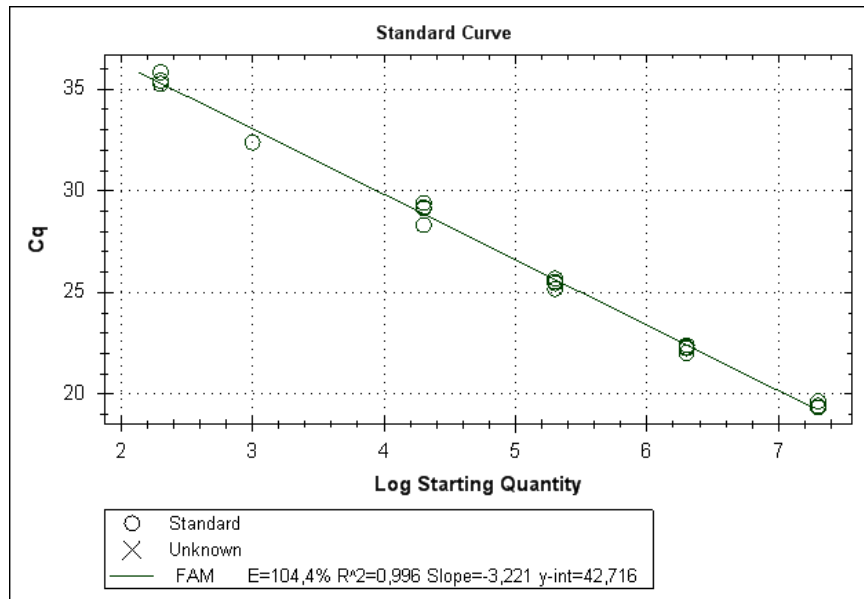


Figura 10 Curva estándar de amplificación de DNA correspondiente a 2×10^7 - 2×10^2 promastigotes de *Leishmania infantum*

Con el fin de comprobar la calidad de la extracción de DNA y de descartar la presencia de inhibiciones en el desarrollo de la técnica que pudieran dar lugar a resultados falsos negativos se recurrió simultáneamente al uso de un control interno de amplificación de una secuencia específica del gen de la β -actina para cada una de las muestras, descrito por Robinson en 2007 como uno de los genes de referencia más indicados para su uso como control endógeno de amplificación en la técnica de PCR cuantitativa.

3.2.5.3 TÉCNICAS ANATOMOPATOLÓGICAS

3.2.5.3.1 PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS

Para la realización del estudio histológico e inmunohistoquímico se partió de los tejidos a estudio recogidos en la necropsia y fijados en una solución de formol tamponado al 10% (durante 24-48 horas). De esta manera se preservó el tejido del deterioro provocado por la putrefacción y autólisis derivada de la muerte celular.

Cada muestra se talló en una cabina de bioseguridad en bloques de unos 2-3 mm de grosor y se introdujeron de dos en dos o de tres en tres (dependiendo del tamaño y tipo de tejido) en cassettes de inclusión. A continuación, se realizó la inclusión en parafina introduciendo dichos cassettes en un inclusor automático de parafina, en condiciones de vacío. En este proceso, se realiza la sustitución del agua tisular por un medio líquido (parafina), capaz de solidificar las

muestras, a fin de proporcionar consistencia a las mismas, que permita la realización posterior de cortes con el micrótopo.

Seguidamente, para la obtención de un bloque de tejido se utilizó una estación de inclusión, también denominada consola de inclusión donde se realizó un enfriamiento lento a 10-15 °C y se orientaron los tejidos en el bloque. Dicha estación también consta de una placa fría para la solidificación del mismo. Para ello se dejaron los bloques en la parafina de la consola durante 30 minutos, a continuación se abrieron los cassettes y se colocaron los tejidos en un molde metálico con un poco de parafina fundida. Se dejaron solidificar a temperatura ambiente sobre la placa fría, formándose así un bloque con el tejido en su interior.

Y, por último, se procedió al corte en el micrótopo. Para ello, primero se enfriaron los bloques durante aproximadamente dos horas depositándolos sobre cubitos de hielo, con el objeto de facilitar el corte posterior. A continuación, se desbastaron los bloques de parafina mediante cortes de 20 µm hasta que todo el tejido quedó representado en el corte. Una vez desbastados se realizaron cortes de 4 µm y se depositaron en un baño termostático a 45°C de modo que los cortes flotasen y pudiesen estirarse con facilidad. Los cortes se recogieron con portaobjetos tratados para inmunohistoquímica y con otros sin tratamiento, para el resto de tinciones.

3.2.5.3.2 TINCIÓN DE HEMATOXILINA – EOSINA

El estudio microscópico de los tejidos se llevó a cabo en cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina con el fin de evaluar las lesiones anatomopatológicas características asociadas a la infección por *L. infantum* en todos los tejidos a estudio.

- Realización de la técnica

En primer lugar, los cortes de 4 micras de los tejidos, sobre portas se desparafinaron en xileno y rehidrataron con concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96% y 70%) durante 5 minutos en cada uno de ellos, más un baño de agua corriente de otros 5 minutos. A continuación se sumergieron los cortes en hematoxilina durante 15 minutos.

Posteriormente y tras un lavado en agua corriente de 10 minutos se sumergieron en eosina durante 30 segundos.

Por último, se deshidrataron los tejidos teñidos en diluciones crecientes de alcohol, se sumergieron en xileno y se procedió al montaje de los portaobjetos con medio de montaje DPX (Dibutylphtalate Poliestireno Xileno)

3.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL TEJIDO MUSCULAR Y REPRODUCTOR MASCULINO

3.3.1 ANIMALES

El primer estudio consta de dos sub apartados como se ha explicado anteriormente, por un lado el estudio del músculo temporal y, por otro, del reproductor masculino consistente en epidídimo y testículo.

Para el estudio del tejido muscular se seleccionaron 31 animales. Por un lado 28 infectados experimentalmente y por otro, tres animales como control negativo. Teniendo en cuenta el material utilizado, el tiempo y los recursos disponibles, se decidió escoger una muestra representativa de la población inicial, seleccionando tanto animales clínicamente sanos como enfermos, así como con títulos altos y bajos en serología y cantidad de DNA de parásito detectada en linfonodo y médula ósea. Así pues, se pudieron relacionar todos estos parámetros con las diferentes características de las lesiones así como el tipo y cantidad de los distintos tipos de células inflamatorias halladas en las mismas. Además, en el estudio inmunohistoquímico se investigó la presencia del parásito en los tejidos y su relación con la presencia e intensidad de la inflamación. En todos los análisis, la técnica fue puesta a punto de forma adecuada.

Del mismo modo, para el estudio del tejido reproductor masculino, se seleccionaron los machos dentro del grupo de 31 animales preseleccionados para el estudio del tejido muscular, quedando así un total de 19 animales. Debido al estado de la muestra de epidídimo de uno de los animales, en este apartado se decidió prescindir del mismo, quedando así 18 animales.

3.3.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

3.3.2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA LESIÓN

El estudio microscópico de los tejidos se llevó a cabo en cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina con el fin de evaluar las lesiones anatomopatológicas características asociadas a la infección por *L. infantum* en tejido muscular y reproductor masculino.

La valoración de las lesiones en músculo y reproductivo se realizó en función de la intensidad de la inflamación así como de las características de la misma. En todos los casos, estos parámetros se compararon con tejidos de animales no infectados.

3.3.2.1.1 INTENSIDAD DE LESIÓN

En función de la intensidad, las lesiones se clasificaron como:

- Ligera/Moderada. Esta se caracteriza por la presencia de células inflamatorias aisladas o de focos esporádicos de células inflamatorias, de pequeño a moderado tamaño. .
- Intensa. Esta se caracteriza por la presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño.

Este parámetro se valoró en toda la muestra utilizándose el objetivo de 10 aumentos.

3.3.2.1.2 TIPO DE LESIÓN INFLAMATORIA

En función del tipo celular, se clasificaron como:

- Linfoplasmocitaria, la cual se caracterizaba por el predominio de linfocitos y células plasmáticas, aunque, en menor grado, podían observarse neutrófilos y/o macrófagos.
- Granulomatosa, caracterizada por el predominio de macrófagos y la presencia esporádica de otras células inflamatorias tales como linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos.

3.3.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

3.3.3.1 DETECCIÓN DE LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS

La caracterización de las poblaciones celulares presentes en la reacción inflamatoria se realizó utilizando anticuerpos específicos frente a linfocitos T, linfocitos B, macrófagos e inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA). En la Tabla 4 se muestran los detalles de estos marcadores. La técnica se puso a punto para cada marcador, y en cada uno de ellos, se probaron varios anticuerpos, descartando algunos de ellos debido a la ausencia de reacción cruzada en perro.

Además, se puso a punto la técnica para la detección de amastigotes de *Leishmania* en los diferentes tejidos.

Tabla 4. Detalles de los marcadores de células inflamatorias.

Anticuerpo Primario				Anticuerpo Secundario
Especificidad	Descripción	Dilución	Referencia	Descripción
Linfocitos T	Rabbit anti-human CD3*	sin diluir	Manson et al. 1989	Envision anti-rabbit (HRP)
Linfocitos B	Mouse anti-human Clone DAK-Pax5*	sin diluir	Torlakovic et al. 2002	Envision anti-mouse (HRP)
CD8	Rabbit anti-human CD8**	1/400	Mansfield et al. 2011	Envision anti-rabbit (HRP)
Macrófagos	Mouse anti-human Clone MAC387*	1/800	Brandtzaeg et al. 1992	Envision anti-mouse (HRP)
IgG	Rabbit anti-dog IgG**	1/6000	-	Envision anti-rabbit (HRP)
IgM	Rabbit anti-human IgM*	sin diluir	Taylor et al. 1974	Envision anti-rabbit (HRP)
IgA	Rabbit anti-human IgA*	sin diluir	Taylor et al. 1974	Envision anti-rabbit (HRP)

*Dako, Denmark A/S

**Abcam, Cambridge, UK

- Realización de la técnica

Para la realización de la técnica, en primer lugar, los cortes de 4 micras de los tejidos, sobre portas pretratados se desparafinaron en xileno y rehidrataron con concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96% y 70%) durante 5 minutos en cada uno de ellos.

Posteriormente, los cortes fueron sometidos al desenmascaramiento de epítomos, el cual se realizó utilizando una solución, de pH bajo o pH alto (Envision FLEX, Target Retrieval Solution: High pH, Ref:K5025 y Low pH, Ref: K8005), según los requerimientos del anticuerpo a estudio, a 96°C durante 20 minutos en un aparato específico (PT LINK Dako Ref: PT10130).

El resto de la técnica se realizó en un teñidor automático Autostainer plus (Dako Citomation Ref: 53800) a temperatura ambiente. El primer paso fue el bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena incubando los cortes en una solución de peróxido de hidrógeno y metanol (Peroxidase Blocking Solution Dako Ref: 52023) durante 5 minutos. Después se realizaron dos lavados de 5 minutos y se distribuyó el anticuerpo primario según su dilución y tiempo de incubación. El tiempo osciló entre media hora y una hora. Como sistema de detección de la inmunoreacción antígeno-anticuerpo se utilizó el kit de Dako Envision System-HRP Labelled Polymer (Anti-Rabbit Ref: K4003, Anti-Mouse Ref: K4001), durante 30 minutos. La reacción se reveló con diaminobenzidina (Dako Liquid DAB + Substrate (Cromogen System) Ref:K3468) durante 5

minutos y finalmente fueron contrastadas con Hematoxina ((Hematoxylin Dako Real Ref:52020) durante 10 minutos

El paso final se correspondió con el montaje, el cual se realizó fuera del teñidor, en una campana de seguridad biológica. Los cortes fueron deshidratados en alcoholes crecientes y finalmente montas utilizando un medio específico (Dako Mounting Medium. Ref: C5703).

- Valoración de la inmunotinción

Los resultados del estudio inmunohistoquímico se evaluaron de forma semicuantitativa con el programa de análisis de imágenes Image J® para cada población celular con las indicaciones de Gutiérrez *et al.* (2012) con algunas modificaciones. El procesado de las imágenes se realizó ajustando los valores de intensidad y contraste de igual manera en todas ellas y el resultado fue expresado en % de área teñida.

Para ello, tras el análisis histológico, se seleccionó la zona lesionada más representativa de cada animal. El estudio del tejido muscular se realizó a 200 aumentos mientras que el testículo y epidídimo lo a 400, todo ello con el microscopio óptico (Nikon Eclipse 80i).

3.3.3.2 DETECCIÓN DE AMASTIGOTES DE *LEISHMANIA* EN TEJIDOS

La detección de amastigotes de *Leishmania* se realizó utilizando como anticuerpo primario, un suero de conejo positivo por xenodiagnóstico, ELISA y por la prueba de rK39 a *Leishmania infantum*. (Cedido por el ISC, Instituto de Salud Carlos III, Madrid). La dilución fue optimizada a 1/6000, durante una hora y a temperatura de laboratorio. Para el resto de la técnica se siguieron los mismos pasos explicados anteriormente utilizando como sistema de detección el kit Dako Envision System-HRP Labelled Polymer (Anti-Rabbit, Ref.K4003). La valoración se realizó como positiva o negativa.

3.3.4 ESTUDIO MOLECULAR

La determinación de la presencia de amastigotes de *Leishmania* mediante técnicas moleculares se realizó mediante la técnica de qPCR en testículo, epidídimo y músculo, y los resultados se compararon con los obtenidos mediante la inmunohistoquímica. También se llevó a cabo para valorar la capacidad de esta técnica para detectarlos. Para ello se pesaron 25 mg de cada tejido a estudio, previamente guardado a -80°C.

En primer lugar se realizó la extracción de DNA de igual manera que la metodología indicada para qPCR en linfonodo y médula ósea.

La realización de la técnica se realizó exactamente igual exceptuando que, para descartar la existencia de posibles inhibiciones de la técnica de qPCR en las muestras de DNA procedentes de testículo, epidídimo y músculo temporal, se elaboró una segunda curva estándar en la que las diluciones seriadas de los promastigotes de cultivo se añadieron directamente en dichos tejidos y se procedió a su amplificación bajo las mismas condiciones (Spiking). Los resultados obtenidos en los tejidos fueron muy similares a aquellos observados previamente para el caso de la curva estándar de promastigotes realizada en agua libre de DNAsas, confirmando la capacidad de la técnica para la detección del parásito en los tres tejidos.

3.4 ESTUDIO DE NGAL COMO BIOMARCADOR DE DAÑO RENAL CRÓNICO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR *LEISHMANIA INFANTUM*

3.4.1 ANIMALES

De los 58 animales a estudio, 32 fueron seleccionados para la valoración de NGAL como marcador de daño renal. De estos, 29, presentaron alteraciones clínicas y laboratoriales compatibles con la enfermedad. Tres animales no fueron infectados y fueron utilizados como control negativo.

3.4.2 MUESTRAS

Además de las muestras de suero, médula ósea y linfonodo referidas en la metodología general para la confirmación de la infección, en este estudio se obtuvieron muestras de orina y de tejido renal para su posterior análisis histológico.

Para la obtención de orina se realizó cistocentesis de la vejiga con ecografía guiada. En primer lugar se desinfectó el área con betadine y, una vez posicionado el animal en decúbito supino o lateral derecho, se puncionó para conseguir una muestra de aproximadamente 10 ml. Las orinas obtenidas se centrifugaron a 300 xg durante 2 minutos y se guardaron a -80°C hasta el posterior análisis.

La obtención del tejido renal se realizó tras la eutanasia de los animales. Las muestras se tomaron con material desechable y se fijaron en formaldehído tamponado al 10% durante 24-48 horas.

Posteriormente se incluyeron en parafina para la realización del análisis histológico, como se ha indicado anteriormente.

3.4.3 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

3.4.3.1. DETERMINACIÓN DEL UPC Y CREA SÉRICA

Con el fin de valorar la función renal se determinó el grado de proteinuria mediante el cálculo del el ratio UPC. Esto se realizó determinando las proteínas y creatinina urinarias mediante la siguiente fórmula:

$$UPC = \frac{\text{Proteína total urinaria}}{\text{Creatinina urinaria}}$$

Además se midió la creatinina sérica (sCr).

Las proteínas urinarias se midieron por el método rojo de pirogalol y molibdato y la creatinina, tanto urinaria como sérica, mediante el método enzimático creatinasa y sarcosina. Estos análisis se realizaron en el Autoanalizador Gemon Star (RAL, Barcelona), en los Laboratorios Albeitar, de Zaragoza.

Una vez obtenidos estos datos se procedió a la formación de grupos de animales basada en las normas establecidas por la Sociedad Internacional de Interés Renal (IRIS, 2015).

Por un lado, se definieron cuatro estados de enfermedad crónica basándose en la concentración de creatinina en sangre (sCr). En el estado 1 se clasificaron los animales que mostraron valores de creatinina <1,4 mg/dL, en el estado 2 valores entre 1,4 y 2 mg/dL, en el estado 3 valores entre 2,1 y 5 mg/dL y, en el estado 4 valores de creatinina en sangre > 5. Los animales en estado 1 se consideraron no azotémicos, en estado 2 con azotemia renal leve, estado 3 con azotemia renal moderada y en estado 4 con riesgo de signos clínicos sistémicos y con crisis urémica. Por otro lado, teniendo en cuenta los valores de UPC, se consideraron a los animales no proteinúricos cuando el ratio UPC fue <0,2, proteinúricos borderline si el ratio UPC fue entre 0,2 y 0,5, y proteinúricos cuando este fue > 0,5.

Así pues, teniendo en cuenta ambos criterios se establecieron 4 grupos, basándonos en la clasificación de García Martínez (2015):

- Grupo 1: No proteinúricos, no azotémico
- Grupo 2: Proteinúrico borderline, no azotémico.

- Grupo 3: Proteinúrico, no azotémico.
- Grupo 4: Proteinúrico, azotémico.

3.4.3.2 DETERMINACIÓN DEL NGAL URINARIO Y CÁLCULO DEL RATIO NGAL URINARIO/CREATININA URINARIA (UNC)

Las concentraciones de NGAL en orina se midieron mediante un ELISA comercial (Dog NGAL ELISA Kit, Bioporto Diagnostics A/S Ref: KIT 043). Tras la descongelación de las muestras de orina, se diluyeron 1/100 y se añadieron por duplicado en placas de 96 pocillos revestidos con un anticuerpo monoclonal de ratón frente a NGAL canino. Tras la incubación de una hora a temperatura ambiente se añadió un anticuerpo de NGAL de perro biotilado y streptavidina-HRP conjugada, entre intervalos de una hora de incubación. A continuación se añadió el sustrato de peroxidasa con TMB (Tetrametilbenzidina) que al reaccionar dio un color azul. Tras diez minutos se paró la reacción enzimática con ácido sulfúrico. La intensidad de color se valoró con un lector de ELISA (Multiscan RC 6.0, Labsystems) a 450 nm. El límite de detección de este test oscila entre 0,4 ng/mL y 40 ng/mL. Para los cálculos estadísticos, a los valores por debajo de límite de detección se les asignó el valor de 0,2 ng/mL

Para el cálculo de los valores de NGAL para cada animal se partió de una recta de calibrado obtenida a partir 6 concentraciones de NGAL crecientes propiciadas por el kit. A partir de la ecuación de la recta se obtuvo la concentración de NGAL correspondiente a cada animal en pg/mL que, a continuación, se pasaron a mg/dL (Figura 11).

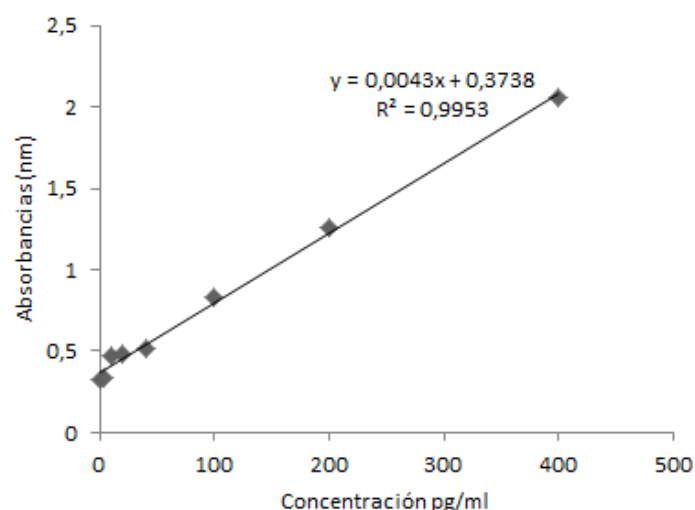


Figura 11 Recta de calibrado y ecuación de la recta para el cálculo de la concentración de NGAL

Una vez obtenidos todos los resultados de NGAL, se calculó el ratio UNC para normalizar los resultados a cada individuo.

3.4.4 ESTUDIO HISTOLÓGICO

La valoración de la lesión renal se realizó mediante las tinciones de Hematoxilina Eosina y PAS. Las muestras fueron procesadas de forma semejante a lo descrito anteriormente.

Para la realización de la tinción PAS se utilizó un kit comercial de Panreac Química S.A.U (Barcelona, España) (Lote: 0000776996) siguiendo las instrucciones del comerciante. A las muestras desparafinadas y rehidratadas se les añadió ácido periódico y reactivo de Schiff durante 10 minutos y 20 minutos respectivamente. A continuación se añadió solución de metasulfito de potasio y solución de fijación durante 2 minutos cada una y, por último hematoxilina de Mayer durante 3 minutos. Tras la posterior deshidratación y lavado con xileno se procedió al montaje.

En función de la lesión glomerular, y de acuerdo a los criterios de Jubb et al. (2015), los animales se agruparon en tres grupos basados en la extensión de la lesión glomerular:

- Grupo Grado 1. Sin alteraciones glomerulares.
- Grupo Grado 2. Glomerulonefritis con <50% de los glomérulos afectados.
- Grupo Grado 3. Glomerulonefritis con >50% de los glomérulos afectados.

Además, se valoró el tipo de glomerulonefritis y la presencia de lesiones tubulares e intersticiales.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los datos y resultados obtenidos se registraron digitalmente en la hoja de cálculo de Microsoft Office Excel 2010 para su posterior análisis con el paquete estadístico SPSS (IMB, SPSS Statistics, vs24) para Windows.

En primer lugar, la descripción de las características de los resultados obtenidos se realizó mediante tablas de frecuencias relativas (porcentajes) en el caso de las variables categóricas o cualitativas y, mediante la media y su desviación estándar o la mediana y su rango (en aquellos casos en los que la muestra presentaba valores extremos) cuando las variables fueron cuantitativas.

Los datos cuantitativos obtenidos en los diferentes estudios realizados fueron evaluados con el test de Kolmogorov-Smirnov para conocer si presentaban una distribución normal. En el caso de que la variable continua presentara una distribución normal se utilizaron métodos estadísticos paramétricos. Como prueba paramétrica para calcular los coeficientes de asociación entre dos variables cuantitativas se utilizó la correlación de Pearson. Como prueba paramétrica para comparar las medias y la dispersión de una variable cuantitativa entre varios grupos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA). En los casos donde el estadístico de Fisher de la ANOVA fue significativo ($P \leq 0,05$) como análisis a posteriori se compararon todas las posibles combinaciones por parejas realizando el test de Student y ajustando por Bonferroni.

Para las variables continuas que no presentaban una distribución normal se utilizaron pruebas no paramétricas. Para detectar y cuantificar la relación entre dos variables continuas no paramétricas se empleó el coeficiente de correlación de Spearman cuya interpretación se basó en la siguiente escala: un valor (Rho) entre 0 y 0,2 se consideró una correlación mínima, entre 0,2 y 0,4 correlación baja, entre 0,4 y 0,6 correlación moderada, entre 0,6 y 0,8 buena y entre 0,8 y 1 muy buena.

La comparación de una variable continua no paramétrica entre grupos se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney cuando se trataba de comparar dos medianas, sin embargo, para comparar más de dos medianas se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. En los casos donde el test de Kruskal-Wallis fue significativo ($P \leq 0,05$) se realizó el test de Dunn como análisis a posteriori para determinar qué niveles de la variable independiente diferían entre sí.

Para realizar el análisis estadístico de dos variables categóricas, se aplicó la prueba no paramétrica de χ^2 de Pearson para tablas de contingencia. Además, la determinación de la concordancia entre variables categóricas se realizó mediante el cálculo del coeficiente Kappa de Cohen, cuya interpretación se basó en la escala propuesta por Thrusfield (Thrusfield, 2007).

En todos los análisis realizados, se consideró un nivel de confianza del 95% (riesgo del 5%), por lo que las diferentes estadísticas se consideraron significativas para un valor de $P < 0,05$. Estos datos se representaron tanto en tablas como en diagramas de cajas y bigotes y gráficos de dispersión.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN Y ELECCIÓN DE LA PRUEBA SEROLÓGICA

4.1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN

4.1.1.1 ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS

El rango de la puntuación clínica (PC) fue variable entre 0 y 12. La PC de todos los animales se recoge en la Tabla 5 y la descripción individual por animal en la Tabla 1-Anexos. Sólo un paciente presentó casi la máxima puntuación (11) y la media se situó en: 3,13 puntos.

Tabla 5. Puntuación clínica (PC) total de cada animal

ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
PC	1	2	1	2	8	0	9	6	11	10	7	3	2	1	4

ID	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
PC	3	5	0	2	0	0	0	0	4	5	2	6	2	3	2

ID	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
PC	2	5	3	2	2	1	3	0	1	1	4	1	1	1	1

ID	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
PC	3	7	3	6	10	2	1	7	2	4	3	2

Ninguno de los tres animales control presentó signos clínicos compatibles con *L. infantum*. (ID: 21, 22 y 23)

Las manifestaciones clínicas observadas en el resto de animales infectados se describen a continuación:

- Pérdida de peso: Presente en el 50% de los perros (27/54), de los cuales el 74% habían perdido <20% y el resto >20%.
- Signos oculares: El 37% de los perros presentó signos oculares (20/54), de los cuales el 22,2% presentó conjuntivitis y el 14,8% uveítis, incluso en uno de ellos se observaron signos iniciales de ceguera.
- Signos cutáneos: El 50% de los animales presentó algún signo cutáneo (27/54). En un 35,1% se observaron alopecias leves y en un 14,8% signos más graves como dermatitis exfoliativa y úlceras.
- Linfadenopatía: Presente en el 53,7% de los animales (29/54).

- Mucosas anémicas: Presente en el 33,3% (18/54).
- Onicogriposis: Presente en el 5,5% (3/54).
- Atrofia músculo temporal: Presente en el 33,3% (18/54).
- Esplenomegalia a la palpación: Presente en el 26% (14/54).

Según la clasificación de los animales según los signos clínicos expresados, el 35% (19/54) fueron oligosintomáticos, es decir con menos de tres síntomas, el 25,9% (14/54) polisintomáticos, con más de tres síntomas, mientras que el 38,8% (21/54) quedaron clasificados como asintomáticos. Los resultados individuales detectados por animal se encuentran en la Tabla 2-Anexos.

4.1.1.2 ESTUDIO SEROLÓGICO

El estado serológico de cada animal se puede observar en la Tabla 3-Anexos. Los animales no infectados fueron seronegativos a ambas técnicas.

Mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, el 9,2% (5/54) de los perros fueron negativos (títulos $<1/40$) y el 90,8% (49/54) positivos. Entre estos últimos, el 42,6% (23/54) fueron positivos en un rango normal (títulos entre $1/40$ y $1/160$) mientras que el 48,2% (26/54) fueron considerados como positivos altos (títulos $>1/160$).

Mediante la técnica de ELISA el 11,1% (6/54) de los animales resultaron negativos (%RIPC $< 0,9$) y el 88,9% positivos (48/54). Además, el 37% (20/54) fueron positivos en un rango normal (%RIPC entre 0,9 y 4) y el 48,2% (26/54) se consideraron positivos altos (%RIPC > 4).

4.1.1.3 ESTUDIO PARASITOLÓGICO:qPCR

Los resultados de la qPCR expresados en parásitos/mg de tejido tanto para linfonodos como para médula ósea se detallan en la Tabla 4-Anexos.

Mediante esta técnica, los tres perros control (no infectados) resultaron negativos. En el resto de animales, el parásito se detectó en proporciones similares en los linfonodos y en la médula ósea. Así, el 72,2% (39/54) de los perros infectados fueron positivos en el linfonodo y el 74,1% (40/54) en la médula ósea. Sin embargo, como puede verse en la Tabla 6, de los 54 animales infectados, 9 (16,7%) resultaron negativos en ambos tejidos. En estos casos se realizó una qPCR alternativa con Sybr Green, puesta a punto en Aquiz Vetek y basada en la descrita por Nicolas *et al.* (2002), confirmándose la infección frente a *Leishmania Infantum* en todos ellos.

Tabla 6. Tabla de contingencia con la frecuencia de los resultados positivos y negativos de las pruebas de qPCR en nódulo linfático y médula de los animales infectados.

		Nódulo linfático		
		Negativo	Positivo	Total
Médula	Negativo	9 (16,7%)	5 (9,3%)	14 (25,9%)
	Positivo	6 (11,1%)	34 (63%)	40 (74,1%)
	Total	15 (27,8%)	39 (72,2%)	54 (100%)

4.1.1.2 INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE LA CLÍNICA, SEROLOGÍA Y PCR

Para confirmar la influencia del sexo sobre los diferentes factores se hizo un análisis comparativo entre el sexo, la clínica, estado serológico y parasitológico de todos los animales a estudio.

Para ello, se realizaron tests no paramétricos ya que las variables a estudio no presentaron normalidad ($P_{K-S} > 0,05$). Como variables continuas se utilizaron los valores de: puntuación clínica total de cada animal, las titulaciones de IFI (pasadas previamente a sus respectivos logaritmos), el %RIPC de ELISA, y resultados de qPCR de linfonodo y médula ósea expresados en células/mg de tejido (pasados previamente a sus respectivos logaritmos).

Como puede apreciarse en la Tabla 7, las mediana (mínimo y máximo) para cada parámetro a estudio es muy similar, no mostrando diferencias significativas entre ambos sexos: $P_{M-W} > 0,05$.

Tabla 7. Mediana, mínimo y máximos de la clínica, serología y carga parasitaria expresado por los animales según el sexo.

	Hembras	Machos	P*
Puntuación Clínica	2 (0-9)	2 (0-11)	0,178
Log IFI	2,2 (3-3,11)	2,2 (3-3,11)	0,659
%RIPC ELISA	3,73 (0,2-7,04)	4,2 (0,15-6,88)	0,580
Log qPCR Médula ósea	5,9 (3-8,65)	5,66 (3-7,6)	0,858
Log qPCR Linfonodo	5,3 (3-8,39)	4,75 (3-7,36)	0,467

P* Significación según Mann-Whitney

Así pues, en este estudio se observó que ni la clínica, ni el estado serológico ni la carga parasitaria estuvieron influenciadas por el sexo de los animales.

4.1.2. ELECCIÓN DE LA TÉCNICA SEROLÓGICA ÓPTIMA

Con el fin de escoger la técnica de diagnóstico serológico más adecuada entre las empleadas en este trabajo para los diferentes análisis en los siguientes capítulos, se procedió al cálculo de la

sensibilidad y especificidad, enfrentándolas al diagnóstico clínico como prueba de referencia. Esta valoración se complementó previamente con el cálculo de concordancia y la correlación entre ambas pruebas.

Además con el fin de hacer una elección lo más objetiva posible, se tuvieron en cuenta también los resultados de la qPCR en médula ósea y en linfonodos.

4.1.2.1 EVALUACIÓN DE LA CONCORDANCIA Y CORRELACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS DE IFI Y ELISA

Para estimar el grado de concordancia entre las dos técnicas se procedió al cálculo del coeficiente de Cohen (Kappa) mediante la elaboración de una tabla de contingencia con los resultados de los 57 animales del estudio analizados por ambas pruebas (Tabla 8).

Tabla 8. Tabla de contingencia con la frecuencia de los resultados positivos y negativos de las pruebas de IFI y ELISA.

		Prueba IFI	
		Positivo	Negativo
Prueba ELISA	Positivo	48 (84,2%)	0 (0%)
	Negativo	1 (1,8%)	8 (14%)

Este análisis reveló un coeficiente kappa de $0,93 \pm 0,06$, confirmando un grado de concordancia muy bueno entre ambas técnicas (Everitt, 1989).

Al observar que los resultados de ambas técnicas guardaron una concordancia muy buena entre sí, se evaluó si las titulaciones de anticuerpos obtenidas mediante IFI y el % de RIPC resultante de ELISA también guardaban correlación. Para ello se procedió al cálculo del coeficiente de correlación Rho de Spearman ya que ambas variables no fueron normales resultando una correlación moderada entre ambas técnicas ($Rho = 0,47$, $P < 0,001$).

Así que, en vista de los resultados de concordancia y correlación, cualquiera de las dos parece ser apropiada para la detección de anticuerpos frente a la infección por *L. infantum*.

4.1.2.3. EVALUACIÓN DE LA CONCORDANCIA Y CORRELACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS SEROLÓGICAS Y qPCR

Respecto al grado de concordancia entre las dos técnicas serológicas y la qPCR en ambos tejidos, fue ligeramente mayor en la técnica de ELISA (Tabla 9).

Tabla 9. Tablas de contingencia con la frecuencia de los resultados positivos y negativos obtenidos mediante las pruebas serológicas de IFI y ELISA y los resultados de qPCR tanto en nódulo linfático como en médula. Resultados e interpretación del Coeficiente Kappa de Cohen.

		qPCR Nódulo linfático	
		Positivo	Negativo
Prueba	Positivo	37 (64,9%)	12 (21,1%)
	Negativo	2 (3,5%)	6 (10,5%)

Coeficiente Kappa: $0,33 \pm 0,12$
Concordancia escasa

		qPCR Médula	
		Positivo	Negativo
Prueba	Positivo	40 (70,2%)	9 (15,8%)
	Negativo	0 (0%)	8 (14%)

Coeficiente Kappa: $0,55 \pm 0,12$
Concordancia moderada

		qPCR Nódulo linfático	
		Positivo	Negativo
Prueba	Positivo	37 (64,9%)	11 (19,3%)
	Negativo	2 (3,5%)	7 (12,3%)

Coeficiente Kappa: $0,39 \pm 0,12$
Concordancia escasa

		qPCR Médula	
		Positivo	Negativo
Prueba	Positivo	40 (70,2%)	8 (14%)
	Negativo	0 (0%)	9 (15,8%)

Coeficiente Kappa: $0,61 \pm 0,11$
Concordancia moderada

Además, la correlación Rho de Spearman reveló mayor correlación entre ELISA y qPCR que entre la técnica de IFI y qPCR (Tabla 10).

Tabla 10. Coeficiente de correlación Rho de Spearman entre los resultados de IFI y ELISA y los resultados de qPCR en linfonodo y en médula.

	qPCR Nódulo linfático		qPCR Médula	
	Rho	P*	Rho	P*
Prueba IFI	0,01	0,916	0,321	0,015
Prueba ELISA	0,551	<0,001	0,716	<0,001

P* Significación de correlación de Spearman

En vista de estos resultados, parece más indicado el uso de ELISA en nuestro trabajo ya que tiene mejores resultados de concordancia y correlación respecto a la qPCR. Lo que quiere decir que la técnica de ELISA es mejor indicador de infección que la técnica IFI.

4.1.2.4. CÁLCULO DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE AMBAS PRUEBAS

En primer lugar, se hizo el cálculo de la sensibilidad y especificidad en ambas pruebas teniendo como prueba de referencia el diagnóstico clínico presentado por los animales. Con lo que el resultado obtenido en este punto se refiere a la fiabilidad de ambas pruebas respecto a la enfermedad.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \times 100$$

Así pues, teniendo en cuenta el punto de corte de la clínica en 1 y los anteriormente citados para IFI (1/40) y ELISA (0,9), el cálculo quedó de la siguiente manera (Tabla 11):

Tabla 11 Distribución de los animales en función de la clínica como referencia de enfermedad.

	IFI	ELISA
Verdaderos positivos (VP)	44	44
Falsos positivos (FP)	4	4
Verdaderos negativos (VN)	3	3
Falsos negativos (FN)	6	6

$$\text{Sensibilidad IFI} = \frac{44}{44+6} \times 100 = 88\% \quad \text{Sensibilidad ELISA} = \frac{44}{44+6} \times 100 = 88\%$$

$$\text{Especificidad IFI} = \frac{3}{3+4} \times 100 = 42,8\% \quad \text{Especificidad ELISA} = \frac{3}{3+4} \times 100 = 42,8\%$$

Pese a que se trataba, en algunos casos, de animales diferentes, el total de VP, FP, VN y FN fue exactamente el mismo en ambas técnicas. Por ello, ambas pruebas presentaron resultados iguales en cuanto a especificidad y sensibilidad.

En cambio, teniendo en cuenta también la qPCR obtuvimos un resultado más objetivo del estado de infección de los animales y, puesto que para nuestro estudio nos interesó valorar la prueba que más se aproximara a infección se planteó lo siguiente:

En primer lugar, se realizaron dos gráficas (Figura 12) para el mejor entendimiento del cálculo. En estas se representaron, a parte de la serología y la clínica, los resultados de qPCR.

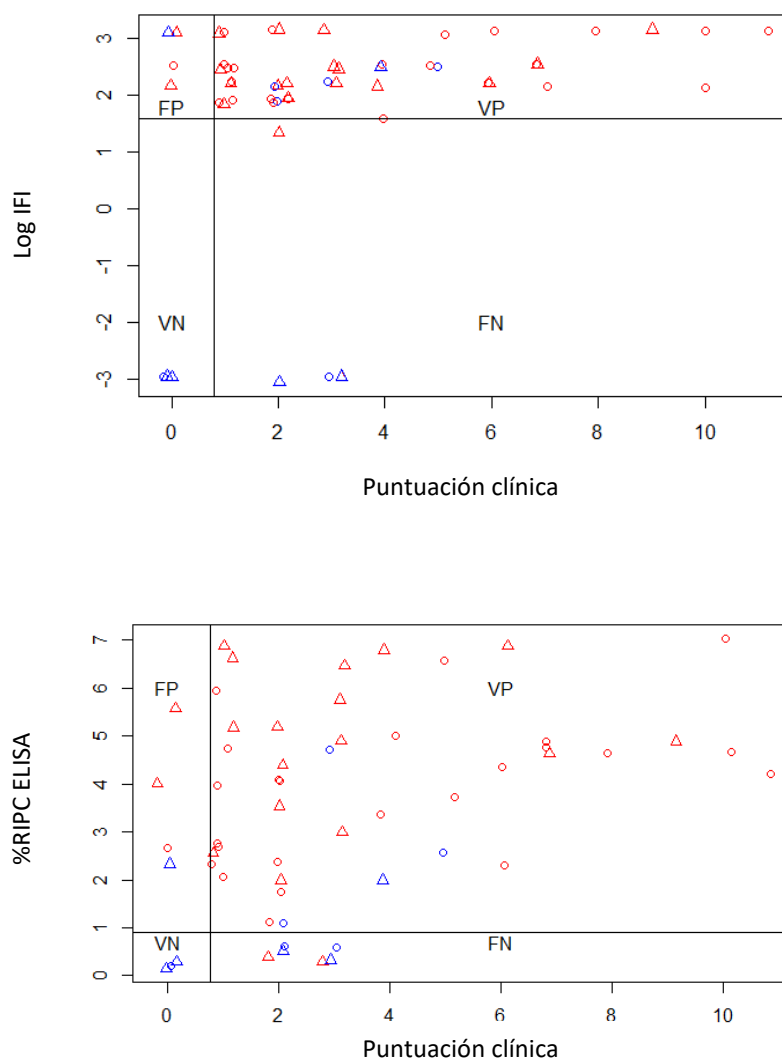


Figura 12. Representación para el cálculo de sensibilidad y especificidad de ELISA e IFI teniendo en cuenta tanto la clínica como la qPCR. Color rojo: Positivo a qPCR por nódulo linfático y/o médula. Color azul: Negativo a qPCR en nódulo linfático y médula. Triángulo: Hembra. Círculo: Macho

A continuación se realizó de nuevo el cálculo de sensibilidad y especificidad para ambas técnicas. La sensibilidad ascendió, ya que en ambas pruebas había seis FN, de los cuales, dos fueron positivos a qPCR (pasaron al grupo de VP), con lo que quedaron cuatro FN que a su vez presentaron clínica.

Por otro lado, la especificidad también ascendió. De los cuatro animales que se consideraron FP, en realidad tres de ellos fueron VP ya que mostraron resultados de qPCR positivos.

Así pues, teniendo en cuenta la clínica, qPCR y la serología, en ambas técnicas la sensibilidad ascendió a un 92,4% y la especificidad a 75%.

Tabla 12. Distribución de los animales en función de la clínica y la qPCR.

	IFI	ELISA
Verdaderos positivos (VP)	49	49
Falsos positivos (FP)	1	1
Verdaderos negativos (VN)	3	3
Falsos negativos (FN)	4	4

$$\text{Sensibilidad IFI} = \frac{49}{49 + 4} \times 100 = 92,4\% \quad \text{Sensibilidad ELISA} = \frac{49}{49 + 4} \times 100 = 92,4\%$$

$$\text{Especificidad IFI} = \frac{3}{3 + 1} \times 100 = 75\% \quad \text{Especificidad ELISA} = \frac{3}{3 + 1} \times 100 = 75\%$$

En vista de los resultados obtenidos, la buena concordancia entre ambas técnicas serológicas y cálculos de sensibilidad y especificidad exactamente iguales, cualquiera de las dos sería idónea para utilizar en los diferentes análisis de los siguientes trabajos.

Así que la elección se basó en los resultados de concordancia y correlación obtenidos entre las técnicas serológicas y la técnica molecular qPCR, quedando entonces más idónea de cara a nuestro trabajo la técnica de ELISA. Además nuestra elección también se basó en los resultados obtenidos en otro trabajo realizado en nuestro grupo de investigación (Ortega, 2016) donde se escogió la técnica de ELISA por no arrojar resultados dudosos.

4.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO EN MÚSCULO TEMPORAL

4.2.1. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

4.2.1.1 CARACTERÍSTICAS LESIONALES

De los 28 animales infectados experimentalmente, 21 (75%) presentaron lesiones a nivel histopatológico mientras que el resto así como los animales control no mostraron lesión alguna.

En función de la intensidad lesional, 12 (42,9%) perros presentaron lesiones de ligeras a moderadas y 9 (32,1%) intensas.

Respecto al tipo de infiltrado inflamatorio, en 13 (46,4%) se observaron lesiones predominantemente linfoplasmocitarias mientras que en 8 (28,6%) fueron predominantemente granulomatosas (Figura 13).

En la Tabla 5-Anexos se describen las lesiones así como las características clínicas obtenidas de forma individual de los animales que presentaron lesión.

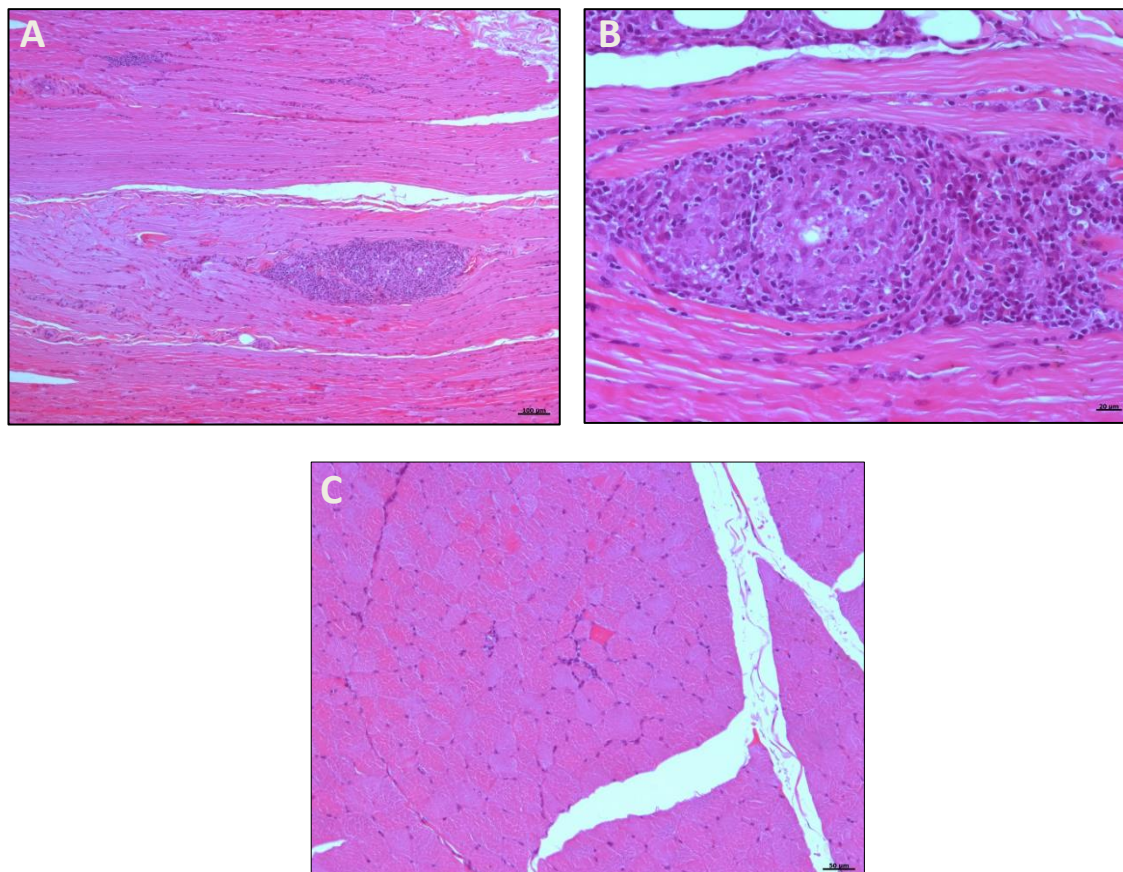


Figura 13. Inflamación en tejido muscular (HE). A: Foco de inflamación de carácter intenso 50x. B: Detalle del foco de inflamación intenso de tipo granulomatoso 200x. C: Foco de inflamación de carácter ligero.

4.2.1.2 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS LESIONALES Y DE SU RELACIÓN CON EL ESTADO CLÍNICO Y ESTADO SEROLÓGICO

Para valorar la relación entre la respuesta inmune de los animales y la expresión clínica de la enfermedad se realizaron tests no paramétricos ya que las variables a estudio no presentaron normalidad ($P_{K-S} > 0,05$).

4.2.1.2.1 RELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD Y TIPO DE LAS LESIONES

Los resultados estadísticos demostraron una relación entre el tipo de lesión y a la intensidad de la misma ($P_{\text{Chi}^2} < 0,001$). Como se observa en la Tabla 13 existe mayor frecuencia de animales con lesión linfoplasmocitaria cuando esta es de intensidad ligera/moderada (32,1%). En cambio, cuando es intensa los animales se distribuyen de forma parecida entre linfoplasmocitaria y granulomatosa.

Tabla 13. Frecuencia de aparición de animales según las características de la lesión (tipo e intensidad)

		Tipo de lesión			
		Ausente	Linfoplasmocitaria	Granulomatosa	Total
Intensidad	Ausente	7 (25%)	0	0	7 (25%)
	Ligera/Moderada	0	9 (32,1%)	3 (10,7%)	12 (49,2%)
	Intensa	0	4 (14,3%)	5 (17,9%)	9 (32,1%)
	Total	7 (25%)	13 (46,4%)	8 (28,6%)	28(100%)

4.2.1.2.2 RELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD DE LA LESIÓN Y EL ESTADO CLÍNICO

Para valorar la relación entre la intensidad de la lesión y el estado general de los animales se recurrió, como variable continua, a la puntuación clínica expresada por cada animal. Los resultados mostraron la existencia de diferencias significativas entre dicha variable y la intensidad de las lesiones ($P_{\text{K-W}} = 0,033$).

Así pues, como se observa en la Tabla 14, se encuentran diferencias significativas en la clínica de los animales cuando la intensidad de la lesión es intensa respecto a la ausencia de lesión ($P = 0,009$). Sin embargo, la mediana de signos clínicos cuando existe lesión, independientemente de su intensidad, es exactamente la misma con lo que no se observan diferencias significativas ($P = 0,254$).

Tabla 14. Medianas (mínimos – máximos) de la clínica de los animales según la intensidad de lesión expresada en músculo facial temporal.

	Intensidad de la lesión			
	Ausente	Ligera/Moderada	Intensa	P*
Puntuación Clínica	2 (1-4) ^a	5 (0-10)	5 (1-11) ^b	0,033

^{a,b,c} Medianas en la misma fila con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,005$) según el test de Dunn.

P* Significación según Kruskal Wallis.

Estos resultados sugieren que los animales con mayor puntuación clínica, es decir, cuando el estado general del animal es peor, presentan mayor intensidad en las lesiones del músculo temporal.

Por otro lado, debido a que la atrofia muscular y el adelgazamiento son unos de los síntomas más frecuentes en la leishmaniosis visceral canina, se estudió si estos pudieran relacionarse con la presencia de miositis. El estudio estadístico demostró que la atrofia muscular no tiene relación con la presencia de inflamación ($P_{Chi2} = 0,172$) pero sí el adelgazamiento ($P_{Chi2} = 0,029$) observándose que un 46,4% de los animales que presentaron lesión, sufrieron pérdida de peso. Estos resultados pueden observarse en las Tablas 15 y 16.

Tabla 15. Frecuencia de los animales según de presencia y ausencia de atrofia muscular y lesión.

		Atrofia músculo temporal		
		NO	SI	Total
Lesión	NO	6 (21,4%)	1 (3,6%)	7 (25%)
	SI	12 (42,9%)	9 (32,1%)	21 (75%)
	Total	18 (64,3%)	10 (35,7%)	28 (100%)

Tabla 16. Frecuencia de los animales según la presencia y ausencia de pérdida de peso y lesión.

		Pérdida de peso		
		NO	SI	Total
Lesión	NO	6 (21,4%)	1 (3,6%)	7 (25%)
	SI	8 (28,6%)	13 (46,4%)	21 (75%)
	Total	14 (50%)	14 (50%)	28 (100%)

4.2.1.2.3 RELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD DE LESIÓN Y EL ESTADO SEROLÓGICO

En este estudio se demostró que el nivel de anticuerpos tiene relación con la intensidad de la lesión ($P_{K-W} = 0,006$) y para ello, como variable continua se utilizó el %RIPC de ELISA expresado por cada animal. Como se observa en la Tabla 17 se encontraron diferencias significativas entre la

ausencia de lesión y la presencia de la misma tanto de intensidad leve/moderada, como intensa ($P=0,004$ en ambos casos)

Tabla 17. Mediana (mínimo – máximo) del %RIPC de ELISA de los animales según la intensidad de lesión expresada en músculo facial temporal.

	Intensidad de la lesión			P*
	Ausente	Ligera/Moderada	Intensa	
%RIPC ELISA	2,05 (1,09-3) ^a	4,36 (1,75-7,04) ^b	4,63 (2,56-6,62) ^b	0,006

a,b,c Medianas en la misma fila con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P<0.005$) según Dunn test.

P* Significación según Kruskal Wallis

Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre ambos grados lesionales ($P=0,860$).

Estos resultados se representan en la Figura 15.

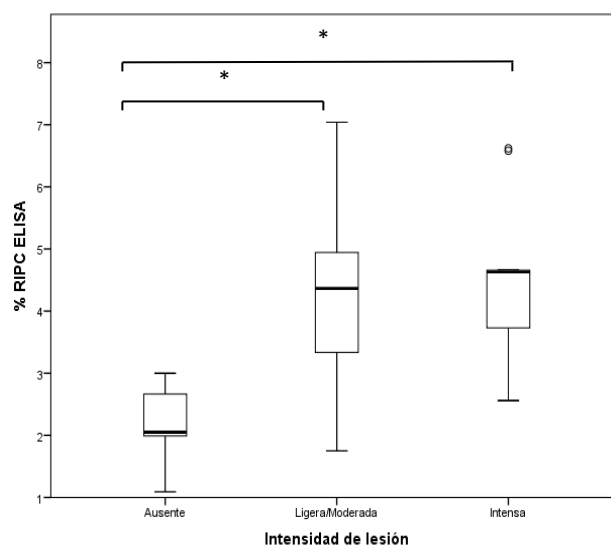


Figura 14. Puntuación clínica en función de la intensidad de lesión. La gráfica muestra la mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), mínimo y máximo (barras). * $P<0,05$

4.2.1.2.4 RELACIÓN ENTRE EL TIPO LESIONAL Y EL ESTADO SEROLÓGICO

Con el fin de valorar la posible relación entre los niveles de anticuerpos detectados por ELISA (clasificados como positivos y muy positivos) y el tipo lesional, se realizaron análisis estadísticos comparando los dos grupos lesionales además de los animales sin lesión (Tabla 18). En ellos, se observó que los niveles altos de anticuerpos se relacionan principalmente con lesiones de tipo linfoplasmocitario (32,1%) y que cuando los niveles son bajos la mayoría son animales sin lesión

(25%). La relación entre el tipo de lesión y la cantidad anticuerpos detectados por ELISA resultó ser estadísticamente significativa ($P_{\text{Chi}^2} = 0,004$)

Tabla 18. Tabla de contingencia con la frecuencia de aparición de animales según el estado serológico clasificado como positivo y positivo alto, y características de lesión (linfoplasmocitaria o granulomatosa)

		Clasificación serología ELISA		
		Positivo (0,9-4)	Muy positivo (>4)	Total
Tipo	Ausente	7 (25%)	0	7 (25%)
	Linfoplasmocitaria	4 (14,3%)	9 (32,1%)	13 (46,4%)
	Granulomatosa	2 (7,1%)	6 (21,4%)	8 (28,6%)
	Total	13 (46,4%)	15 (53,6%)	28 (100%)

Por otro lado, cuando se valoró distribución del % de anticuerpos detectados por ELISA en función del tipo de lesión detectado por histología se observaron diferencias significativas ($P_{\text{K-W}} = 0,006$) entre la ausencia de lesión y los dos tipos de lesión. Sin embargo, pese a que la mediana de anticuerpos de los animales con lesiones granulomatosas es menor, el nivel de anticuerpos no mostró diferencias significativas entre ambos tipos lesionales ($P = 0,876$) (Tabla 19).

Tabla 19. Medianas (mínimos – máximos) del %RIPC de ELISA de los animales según el tipo de lesión expresada en músculo temporal.

	Tipo de lesión			
	Ausente	Linfoplasmocitaria	Granulomatosa	P*
%RIPC ELISA	2,05 (1,09-3) ^a	4,63 (1,75-7,04) ^b	4,36 (2,56-6,620) ^b	0,006

^{a,b}, Medianas en la misma fila con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,005$) según Dunn test

P* Significación según Kruskal Wallis

4.2.2 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Los resultados de este estudio se dividen en varias partes. Por un lado se describen los tipos celulares encontrados y se analizan para valorar la relación entre los mismos así como su relación con las características de lesión (intensidad y tipo).

4.2.2.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS TIPOS CELULARES

El estudio inmunohistoquímico reveló la presencia de linfocitos T CD3 en el 100% de las lesiones de miositis de los 21 animales que presentaron lesión. Estos se distribuyeron por la lesión de forma multifocal o difusa, y la cantidad de los mismos fue variable en los distintos tipos lesionales (Figura 16).

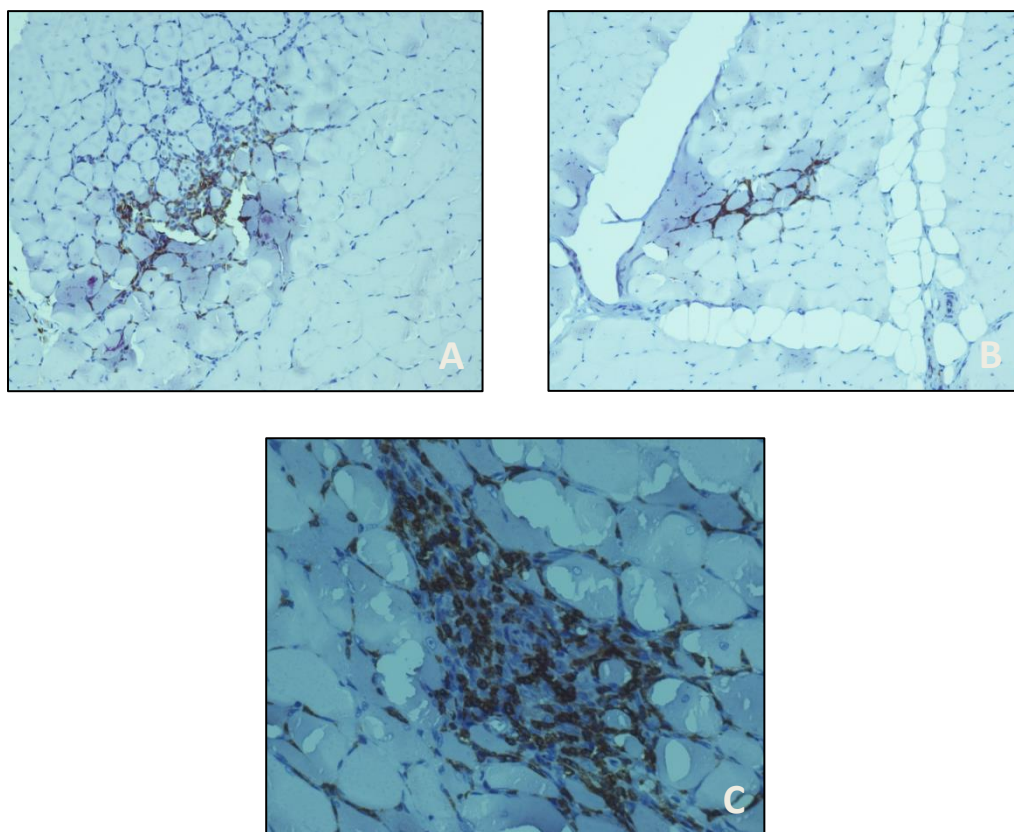


Figura 15. Imágenes de Linfocitos T CD3 detectados por Inmunohistoquímica en músculo temporal. A y B : presencia de CD3 en lesiones de carácter Ligero/Moderado. 200x. C: presencia de CD3 en lesión de carácter Intenso. 400x.

Los linfocitos CD8 se encontraron en el 90,5% (19/21) de las lesiones y relacionados, principalmente, con áreas de infiltrado inflamatorio intenso. (Figura 17). La comparación entre la inmunohistoquímica frente a los CD3 y los CD8, sugiere que la mayoría de los linfocitos T son CD8.

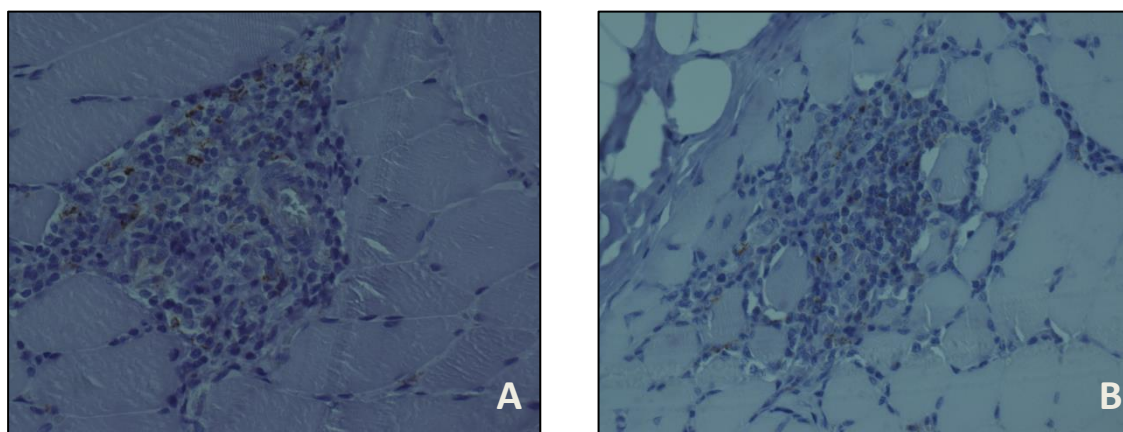


Figura 16. Imágenes de Linfocitos T CD8 detectados por Inmunohistoquímica en músculo temporal. A y B : presencia de CD8 en lesiones de carácter Intenso. 400x

Los linfocitos B se detectaron en un 66,7% (14/21) de las lesiones y, al igual que los linfocitos T CD3, se encontraron de forma multifocal y difusa por la lesión pero generalmente en cantidad menor que los CD3 (Figura 18).

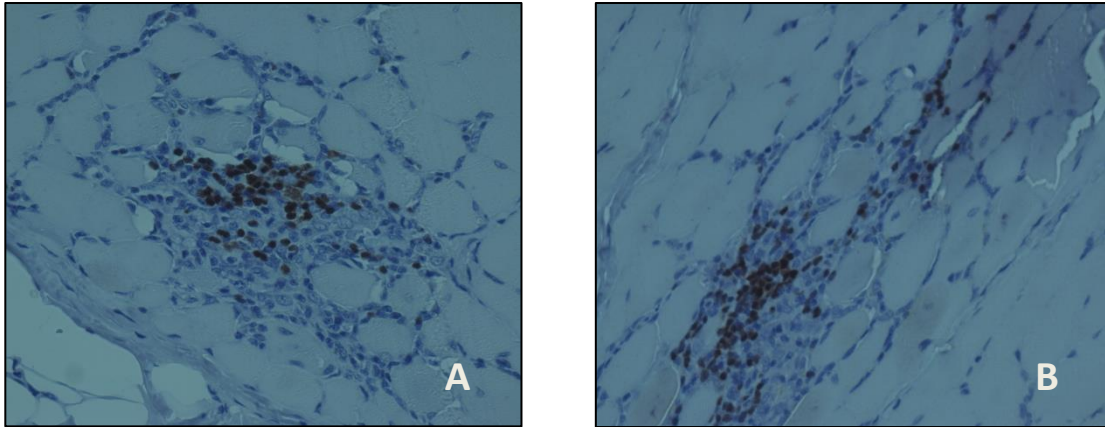
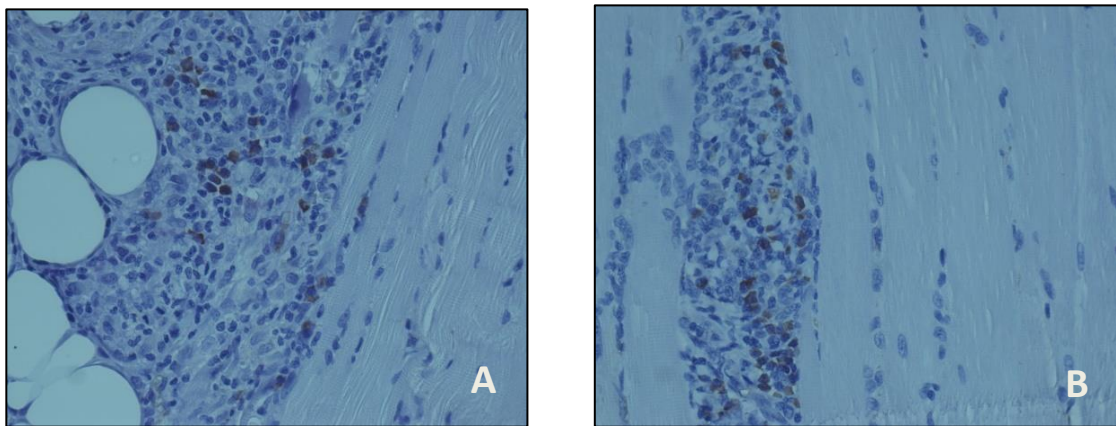


Figura 17. Imágenes de Linfocitos B detectados por Inmunohistoquímica en músculo temporal. A : presencia de linfocitos B en lesiones de carácter Intenso. 400x. B : presencia de linfocitos B en lesiones de carácter Moderado. 400x.

Respecto al estudio de las inmunoglobulinas, las IgG se encontraron en un 61,9% (13/21) de animales y las IgM en un 42,9% (9/21), mientras que las IgA no se detectaron en ninguna lesión. Ambas inmunoglobulinas aparecían de forma conjunta y en lesiones de mayor intensidad (Figura 18).



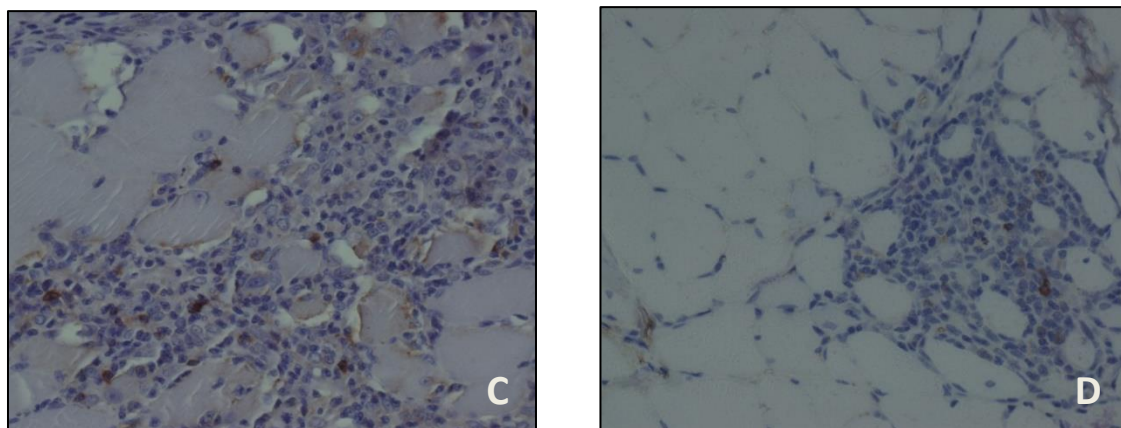


Figura 18. Imágenes de las inmunoglobulinas detectados por Inmunohistoquímica en músculo temporal. A y B : presencia de IgG en lesiones de carácter Intenso. 400x. C y D : presencia de IgM en lesiones de carácter Intenso. 400x.

Los macrófagos se detectaron en el 66,7% (14/21) de los animales, observándose tanto en lesiones de tipo ligero/moderado como intenso, aunque variando en cantidad (Figura 19).

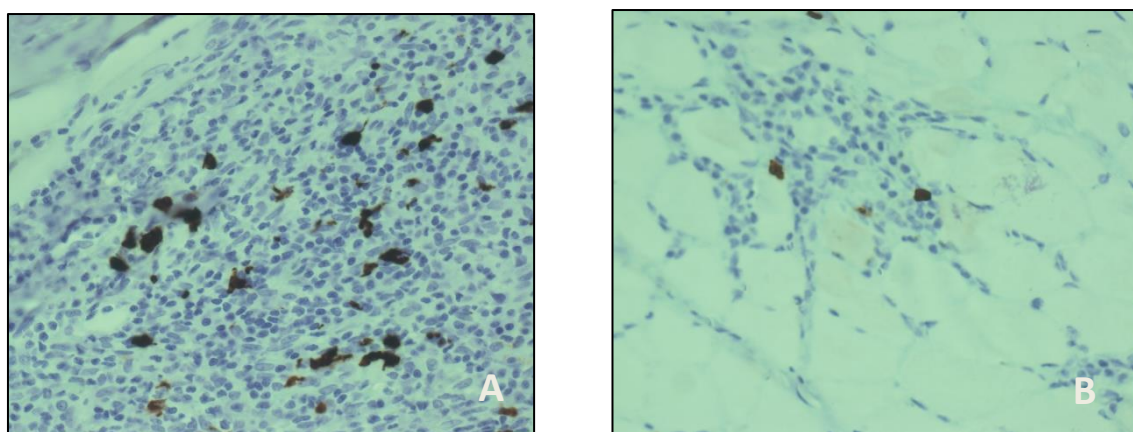


Figura 19. Imágenes de macrófagos detectados por Inmunohistoquímica en músculo temporal. A : presencia de macrófagos en lesiones de carácter intenso. 400x. B : presencia de macrófagos en lesiones de carácter moderado. 400x.

En los siete animales sin lesión muscular no se detectaron células inflamatorias ni inmunoglobulinas mediante inmunohistoquímica.

4.2.2.2 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS TIPOS CELULARES Y SU RELACIÓN CON LA INTENSIDAD Y EL TIPO DE LESIÓN

Con el fin de aportar información sobre la patogenia de la lesión, se realizó un estudio comparativo entre todos los tipos celulares registrados por IHQ así como la relación de los mismos con la intensidad de lesión registrada en el análisis histológico de los 28 animales (con inflamación y sin inflamación).

Para ello se utilizaron tests no paramétricos ya que todos los tipos celulares expresaron una distribución no normal ($P_{K-S} > 0,05$).

4.2.2.2.1 RELACIÓN ENTRE LOS TIPOS CELULARES

De acuerdo a lo expuesto en el material y métodos, debido a la imposibilidad de hacer un recuento individual celular, se valoró el % de área inmunoteñida para cada anticuerpo para su posterior comparación estadística. Esto se realizó con el programa Image J y los resultados pueden observarse en la Tabla 6-Anexos.

Los resultados obtenidos por Image J nos permitieron valorar el grado de relación entre los tipos celulares presentes en las lesiones. Así pues, la relación entre los tipos celulares (Rho) osciló entre 0,4 y 0,7, es decir, entre moderada y buena. En la Tabla 20 se detallan los resultados estadísticos arrojados por el test de correlación de Spearman.

Tabla 20. Correlación de Spearman entre los tipos celulares.

	Rho	P*
CD3 - CD8	0,656	<0,001
CD3 - PAX5	0,568	0,002
CD3 - MAC387	0,459	0,014
CD8 - MAC387	0,705	<0,001
CD3 - IgG	0,487	0,009
CD3 - IgM	0,549	0,002
Pax5 - MAC387	0,665	<0,001
Pax5 - IgG	0,47	0,011
Pax5 - IgM	0,521	0,004
Mac387 - IgG	0,532	0,004
Mac387 - IgM	0,640	<0,001
IgG - IgM	0,553	0,002

P* Significación de correlación de Spearman

4.2.2.2.2 RELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD DE LA LESIÓN Y LOS TIPOS CELULARES

En este análisis, se comprobó que la cantidad de células inflamatorias varían en función de la intensidad de lesión mostrando, en todos los casos, diferencias significativas entre los grados de intensidad ($P_{K-W} < 0,05$, en todos los casos). Tras analizar las diferencias entre cada uno de los grupos, se observó que las medianas de las células aumentó respecto a la intensidad de lesión de manera progresiva, incluso, arrojando diferencias significativas entre los animales sin lesión y con lesión tanto ligera/moderada como Intensa. Además, ningún animal sin lesión presentó ningún tipo celular a estudio (Tabla 21).

Tabla 21. Mediana (mínimo – máximo) del % de área expresado por cada tipo celular según la intensidad de lesión expresada en músculo temporal.

		Intensidad de la lesión			
		Ausente	Ligera/Moderada	Intensa	P*
Tipos celulares	CD3	0 (0-0) ^a	0,917 (0,08-5,26) ^b	4,422 (0,25-27,85) ^b	<0,001
	CD8	0 (0-0) ^a	0,075 (0-0,198) ^b	0,303 (0,066-0,421) ^c	<0,001
	Pax-5	0 (0-0) ^a	0,0265 (0-1,339) ^b	0,161 (0-1,754) ^b	0,009
	Mac387	0(0-0) ^a	0,015 (0-0,372) ^a	0,478 (0-3,196) ^b	0,001
	IgG	0 (0-0) ^a	0 (0-0,856) ^b	0,2967 (0-2,268) ^b	0,017
	IgM	0 (0-0) ^a	0 (0-0,551) ^a	0,18 (0-5,102) ^b	0,003

^{a,b,c} Medianas en la misma fila con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P_n < 0,005$) según el test Dunn

P* Significación de Kruskal Wallis.

Además, con el fin de corroborar que los tipos celulares aumentan en relación a la intensidad de la lesión, se realizó la correlación de Spearman resultando entre moderada y muy buena como se observa en la Tabla 22.

Tabla 22. Correlación de Spearman entre intensidad de lesión y tipos celulares.

Intensidad de lesión/ tipos celulares		Rho	P*
Tipos celulares	CD3	0,768	<0,001
	CD8	0,855	<0,001
	Pax-5	0,581	0,001
	Mac387	0,725	<0,001
	IgG	0,532	0,004
	IgM	0,623	<0,001

P* Significación de correlación de Spearman

4.2.2.2.3 RELACIÓN ENTRE EL TIPO DE LESIÓN Y LOS TIPOS CELULARES

Se comprobó que la cantidad de células inflamatorias varía en función del tipo de lesión mostrando, en todos los casos, diferencias significativas entre los grados de intensidad ($P_{K-W} < 0,05$) a excepción de las inmunoglobulinas M ($P_{K-W} = 0,131$). Tras analizar las diferencias entre cada uno de los grupos se observó que las medianas de las células siempre era mayor cuando la lesión era de tipo granulomatoso. Por otro lado, ningún animal sin lesión presentó ningún tipo celular a estudio (Tabla 23).

Tabla 23. Mediana (mínimo – máximo) del % de área expresado por cada tipo celular según el tipo de lesión expresada en músculo temporal.

		Tipo de lesión			
		Ausente	Linfoplasmocitaria	Granulomatosa	P*
Tipos celulares	Linfocitos T	0 (0-0) ^a	0,917 (0,08-5,26) ^b	4,422 (0,25-27,85) ^b	<0,001
	CD8	0 (0-0) ^a	0,075 (0-0,198) ^b	0,303 (0,066-0,421) ^b	0,001
	Pax-5	0 (0-0) ^a	0,0265 (0-1,339) ^b	0,161(0- 1,754) ^b	0,012
	Mac387	0(0-0) ^a	0,015 (0-0,372) ^a	0,478 (0-3,196) ^b	0,002
	IgG	0 (0-0) ^a	0 (0-0,856) ^a	0,2967 (0-2,268) ^b	0,003
	IgM	0 (0-0)	0 (0-0,551)	0,18 (0-5,102)	0,131

^{a,b}, Medianas en la misma fila con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,005$) según el test de Dunn. P^*

Significación de Kruskal Wallis.

4.2.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y MOLECULAR DEL PARÁSITO Y DE SU ASOCIACIÓN CON LAS LESIONES

En este apartado, se valoró la presencia de amastigotes en tejido muscular, determinada mediante IHQ y qPCR, y su relación con la intensidad de la lesión y el tipo celular.

4.2.3.1 RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DEL PARÁSITO Y LA INTENSIDAD DE LA LESIÓN

En primer lugar, la IHQ demostró la presencia de amastigotes en un 23,8% (5/21) de los animales con lesión y siempre asociados lesiones de carácter intenso. (Figura 20; Tabla 24). Esta relación resultó ser estadísticamente significativa ($P_{\text{Chi}^2} = 0,002$). No se detectaron parásitos en los animales control ni en los animales infectados pero sin lesión.

Tabla 24. Frecuencia de animales positivos y negativos a la detección de amastigotes por IHQ respecto a la intensidad de lesión

		IHQ	
		Negativo	Positivo
Intensidad de lesión	Ausente	7 (25%)	0
	Ligera/Moderada	12 (42,9%)	0
	Intensa	4 (14,3%)	5 (17,9%)

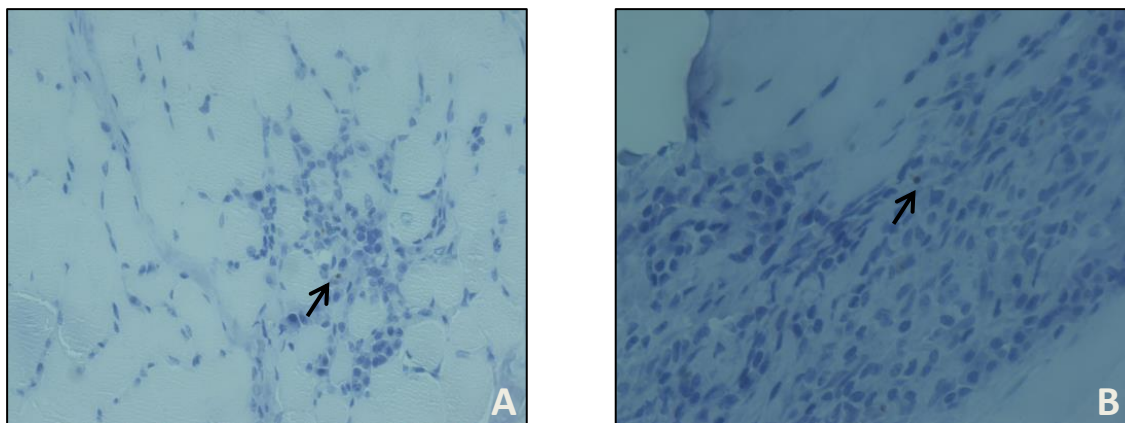


Figura 20 Imágenes de amastigotes detectados por Inmunohistoquímica. A : presencia de amastigotes en lesión de carácter Intenso. 40x. B: presencia de amastigote en lesiones de carácter Intenso. 60x. Las flechas señalan los amastigotes.

Por otro lado, mediante la técnica de qPCR, la *Leishmania* se detectó también en 5 animales de los 21, sin embargo, solo en dos ambas técnicas fueron positivas conjuntamente (ID: 9 y 10). En ambos casos, las lesiones fueron de carácter Intenso. Mientras que la IHQ solo detectó el parásito en lesiones intensas, la qPCR lo detectó tanto en lesiones leves como en intensas. El análisis estadístico de ambas técnicas detectó relación para la IHQ pero no para la qPCR ($P_{\text{Chi}^2} = 0,358$) entre el grado lesional y la presencia del parásito (Tabla 25). Todos resultados de forma individual se encuentran en la Tabla 7-Anexos.

Tabla 25. Frecuencia de animales positivos y negativos a la detección de parásito por qPCR respecto a la intensidad de lesión

		qPCR	
		Negativo	Positivo
Intensidad de lesión	Ausente	7 (25%)	0
	Ligera/ Moderada	9 (32,1%)	0
	Intensa	7 (25%)	2 (7,1%)

Debido a estas diferencias en la detección del parásito, la concordancia entre ambas técnicas fue mala (Tabla 26; Kappa= $0,27 \pm 0,224$).

Tabla 26. Tabla de contingencia de la frecuencias de los resultados de qPCR y de IHQ para la detección de amastigotes de *Leishmania infantum*.

		IHQ		Total
		Negativo	Positivo	
qPCR	Negativo	20 (71,4%)	3 (10,7%)	23 (82,1%)
	Positivo	3 (10,7%)	2 (7,1%)	5 (17,9%)
Total		23 (82,1%)	5 (17,9%)	28 (100,0%)

Todos los resultados individuales obtenidos quedan representados en la Tabla 6-Anexos.

4.2.3.2 RELACIÓN ENTRE LA DETECCIÓN DEL PARÁSITO Y LOS TIPOS CELULARES

Todos los tipos celulares estudiados así como las inmunoglobulinas, excepto las IgG ($P_{M-W} = 0,061$), mostraron buena relación con la presencia del parásito detectada mediante inmunohistoquímica. Es decir, como se observa en la Tabla 25, la mediana de todos los tipos celulares aumenta de forma significativa en presencia de amastigotes. Entre el tipo celular, su asociación fue mayor con los macrófagos ($P_{M-W} = 0,001$).

Tabla 27. Mediana (mínimo – máximo) del % de área expresado por cada tipo celular según la intensidad de lesión expresada en tejido muscular

		Amastigotes IHQ		P*
		Negativo	Positivo	
Tipos celulares	CD3	0,425 (0-7,09) ^a	4,422 (0,67-27,85) ^b	0,033
	CD8	0,057 (0-0,421) ^a	0,29 (0,066-0,344) ^b	0,045
	Pax-5	0 (0-1,754) ^a	0,406 (0,097- 0,896) ^b	0,019
	Mac387	0 (0-1,38) ^a	0,792 (0,230-3,196) ^b	0,001
	IgG	0 (0-0,856) ^a	0,378 (0,067-2,268) ^a	0,061
	IgM	0 (0-0,551) ^a	0,18 (0-5,102) ^b	0,045

^{a,b} Medianas en la misma fila con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,005$) según el test de Dunn.

P* Significación de Mann Whitney.

Sin embargo, cuando se valoró la relación entre los tipos celulares y la presencia de DNA del parásito mediante qPCR no se encontraron diferencias significativas entre ambas variables ($P_{M-W} > 0,05$ en todos los casos).

4.3 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO EN TESTÍCULO

4.3.1. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

4.3.1.1 CARACTERÍSTICAS LESIONALES

De los 18 animales infectados experimentalmente en los que se estudió el testículo, 10 (55,6%) presentaron lesiones a nivel histológico. En el animal control no se observaron lesiones.

Las características lesionales, tanto el tipo celular como la intensidad de las mismas, y la puntuación clínica para cada animal pueden observarse en la Tabla 8-Anexos.

La clasificación, tanto en intensidad como en el tipo celular, fue la misma que la realizada en el músculo temporal. Así, respecto a la intensidad lesional, 6 (33,3%) presentaron lesiones de ligeras a moderadas y 4 (22%) intensas, mientras que en 8 (44,4%) no se observaron lesiones.

Respecto al tipo de infiltrado inflamatorio, en 8 (44,4%) se observaron lesiones predominantemente linfoplasmocitarias mientras que en 6 (33,3%) fueron predominantemente granulomatosas.

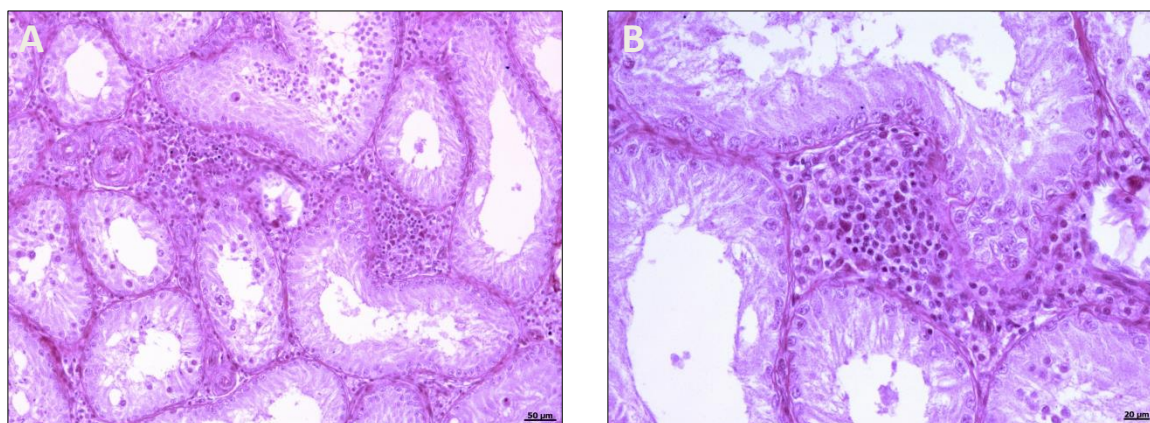


Figura 21. Inflamación y atrofia en testículo (HE). A: Inflamación multifocal de carácter moderado. 100x. B: Foco inflamatorio moderado de tipo granulomatoso 200x

4.3.1.2 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS LESIONALES Y DE SU RELACIÓN CON EL ESTADO CLÍNICO Y ESTADO SEROLÓGICO

Del mismo modo que para el estudio de tejido muscular, las características lesionales se relacionaron con el estado clínico y serológico de los animales. Los test estadísticos que se

emplearon fueron no paramétricos ya que las variables a estudio tampoco presentaron normalidad ($P_{K-S} > 0,05$)

4.3.1.2.1 RELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD Y TIPO DE LAS LESIONES

Similarmente a lo observado en el músculo temporal, las lesiones de carácter linfoplasmocitario se asociaron principalmente con lesiones de intensidad ligera a moderada (22,2%), mientras que en lesiones intensas se pudieron observar ambos tipos de lesiones en la misma proporción (11,1% en ambos casos) (Tabla 28). Además, estadísticamente se observó relación entre el tipo de lesión respecto a la intensidad de la misma ($P_{\text{Chi}^2} < 0,001$).

Tabla 28. Tabla de contingencia con la frecuencia de animales según el tipo de lesión y la intensidad de la misma en testículo.

		Tipo de lesión			
		Ausente	Linfoplasmocitaria	Granulomatosa	Total
Intensidad	Ausente	8 (44,4%)	0	0	8 (44,4%)
	Ligera/Moderada	0	4 (22,2%)	2 (11,1%)	6 (33,3%)
	Intensa	0	2 (11,1%)	2 (11,1%)	4 (22,2%)
	Total	8 (44,4%)	6 (33,3%)	4 (22,2%)	18(100%)

4.3.1.2.2 RELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD LA LESIÓN Y EL ESTADO CLÍNICO

En el presente estudio se demostró que el estado general de los animales valorado con la puntuación clínica de cada animal, tiene relación con la intensidad de la lesión ($P_{K-W} = 0,027$).

Además, como se observa en la Tabla 29, se encontraron diferencias significativas en las medianas de los signos clínicos entre la ausencia de lesión y la presencia de la misma tanto de intensidad leve/moderada, como intensa ($P = 0,025$ y $P = 0,026$, respectivamente).

Tabla 29. Medianas (mínimos – máximos) de la clínica de los animales según la intensidad de lesión expresada en el testículo.

	Intensidad de la lesión			
	Ausente	Ligera/Moderada	Intensa	P^*
Puntuación Clínica	2 (0-6) ^a	6,5 (2-10) ^b	7,5 (4-11) ^b	0,027

^{a,b}, Medianas en la misma fila con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,005$) según el test de Dunn

P^* Significación según Kruskal Wallis

Estos resultados sugieren que el deterioro del estado general (mayor puntuación clínica) expresado por los animales se asocia con una mayor intensidad lesional en testículo.

4.3.1.2.3 RELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD DE LESIÓN Y EL ESTADO SEROLÓGICO

No se observó relación entre el grado de intensidad de lesión observada en el testículo y la cantidad de anticuerpos valorados mediante el % RIPC de ELISA ($P_{K-W} = 0,388$). Es decir, las medianas de los anticuerpos distribuidos entre los grupos de intensidad de lesión no mostraron diferencias significativas.

4.3.1.2.4 RELACIÓN ENTRE EL TIPO LESIONAL Y EL ESTADO SEROLÓGICO

En este caso, tampoco se observó relación entre el tipo de lesión y el estado serológico de los animales, según los resultados arrojados por el análisis estadístico ($P_{K-W} = 0,443$). Sin embargo, se observa que la mediana del nivel de anticuerpos es mayor cuando la lesión es de tipo linfoplasmocitaria que cuando es de tipo granulomatosa (Tabla 30).

Tabla 30. Mediana (mínimo – máximo) del %RIPC de ELISA de los animales según el tipo de lesión expresada en testículo

	Tipo de lesión			
	Ausente	Linfoplasmocitaria	Granulomatosa	P^*
%RIPC ELISA	3,25 (1,09-5)	4,775 (1,750-7,04)	3,36 (2,56-4,64)	0,443

P^* Significación según Kruskal Wallis

4.3.2 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

4.3.2.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS TIPOS CELULARES

El estudio inmunohistoquímico reveló la presencia de linfocitos T CD3 en el 90% (9/10) de los animales que presentaron lesión. Su distribución en la lesión fue de forma tanto multifocal como difusa, y en cantidad variable (Figura 22).

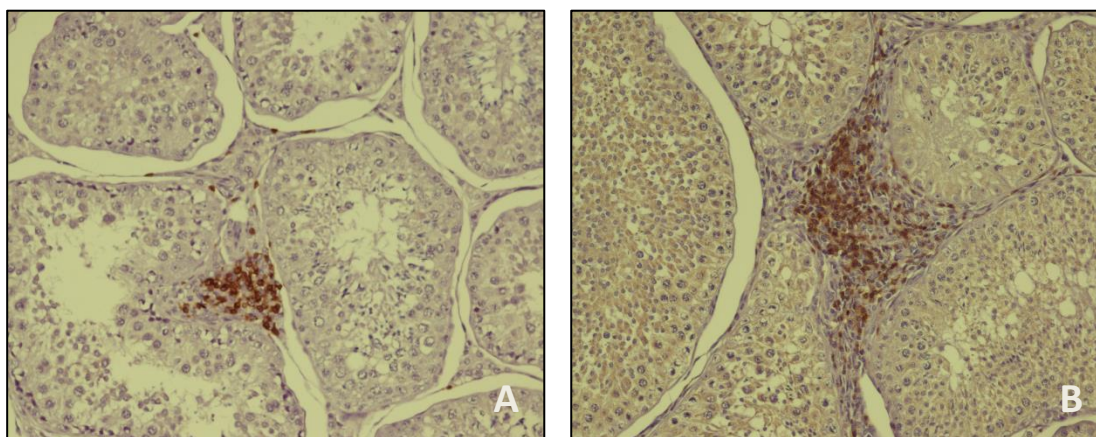


Figura 22. Imágenes de Linfocitos T CD3 detectados por Inmunohistoquímica en testículo. A : presencia de linfocitos T en lesión de carácter ligero. 200x. B : presencia de linfocitos T en lesiones de carácter intenso. 200x.

Los linfocitos T citotóxicos CD8, encontrados siempre asociados a los linfocitos T CD3, se observaron en un 60% (6/10) de los animales y normalmente, en áreas de infiltrado inflamatorio intenso (Figura 23).

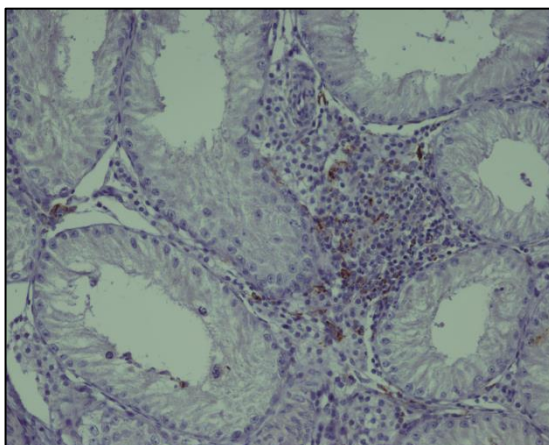


Figura 23. Imagen de Linfocitos T CD8 detectados por Inmunohistoquímica en testículo en infiltrado de carácter intenso. 200x.

Respecto a los Linfocitos B se detectaron en un 40% (4/10) de los animales que, al igual que los linfocitos T CD3 se encontraron sobre todo en áreas de inflamación intensa (Figura 24).

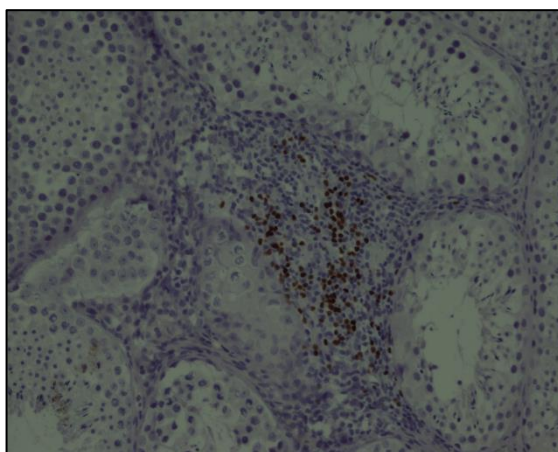


Figura 24. Imagen de Linfocitos B detectados por Inmunohistoquímica en testículo en infiltrado de carácter intenso. 200x.

Respecto al estudio de las inmunoglobulinas, las IgG se encontraron en un 40% (4/10) y las IgM en un 50% (5/10), mientras que las IgA no se detectaron en ninguna lesión. Ambas inmunoglobulinas se detectaron en lesiones de mayor intensidad (Figura 25).

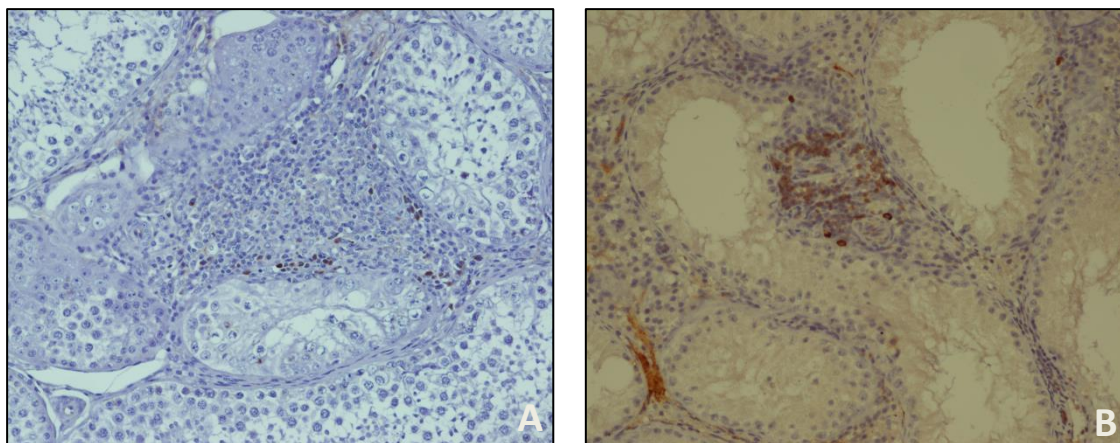


Figura 25. Imágenes de las inmunoglobulinas detectados por Inmunohistoquímica en testículo. A : presencia de IgG en lesión de carácter intenso. 200x. B: presencia de IgM en lesión de carácter intenso. 200x.

Respecto a la presencia de macrófagos se registró en un 70% (7/10) de los animales con lesión y asociados a áreas de infiltrado intenso distribuidos de forma focal o multifocal en la lesión. En dos animales, se observaron macrófagos aislados sin focos inflamatorios asociados, considerándose como células residentes (ID: 3 y 18) (Figura 26).

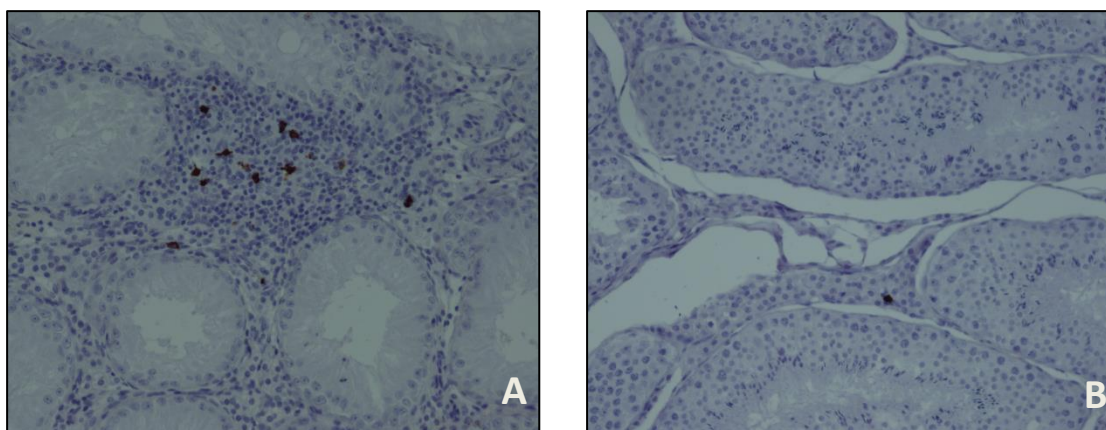


Figura 26. Imágenes de macrófagos detectados por Inmunohistoquímica en testículo. A: presencia de macrófagos en lesiones de carácter Intenso. 200x. B: presencia de macrófagos en zona sin lesión.200x.

En los ocho animales sin lesión testicular no se observó ninguna célula inflamatoria ni inmunoglobulinas pese a estar infectados, a excepción de los dos animales referidos en el párrafo anterior.

4.3.2.2 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS TIPOS CELULARES Y SU RELACIÓN CON LA INTENSIDAD Y EL TIPO DE LESIÓN

Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizaron tests no paramétricos ya que todas las variables a estudio mostraron una distribución no normal ($P_{K-S} > 0,05$).

4.3.2.2.1 RELACIÓN ENTRE TIPOS CELULARES

Para la posterior comparación estadística y tras el procesado de imágenes con el programa Image J, se obtuvo el % de área marcada para cada anticuerpo (Tabla 9-Anexos).

Los resultados obtenidos nos permitieron valorar el El grado de relación entre los diferentes tipos celulares, el cual osciló entre 0,2 y 0,8, es decir, entre baja (como es el caso de la correlación entre los Linfocitos B e IgG), y muy buena (Tabla 31).

Tabla 31. Correlación de Spearman entre los tipos celulares en testículo.

	Rho	P
CD3 - CD8	0,889	<0,001
CD3 - PAX5	0,616	0,006
CD3 - MAC387	0,713	0,001
CD8 - MAC387	0,712	0,001
CD3 - IgG	0,719	0,001
CD3 - IgM	0,825	<0,001
Pax5 - MAC387	0,857	0,010
Pax5 - IgG	0,274	0,271
Pax5 - IgM	0,588	0,010
Mac387 - IgG	0,506	0,032
Mac387 - IgM	0,719	0,001
IgG - IgM	0,828	<0,001

P* Significación de correlación de Spearman

4.3.2.2.2 RELACIÓN ENTRE INTENSIDAD DE LESIÓN Y TIPOS CELULARES

Tras el análisis, se observó que la cantidad de células inflamatorias aumentan en función de la intensidad de lesión mostrando diferencias significativas entre los grados de intensidad ($P_{K-W} < 0,05$, en todos los casos) a excepción de los linfocitos B que, pese a que su mediana aumentó progresivamente con la lesión, no mostró diferencias significativas ($P_{K-S} = 0,136$) (Tabla 32).

Tabla 32. Medianas (mínimos – máximos) del % de área expresado por cada tipo celular según la intensidad de lesión expresada en testículo.

		Intensidad de la lesión			P*
		Ausente	Ligera/Moderada	Intensa	
Tipos celulares	CD3	0 (0-0) ^a	0,8645 (0-1,966) ^b	3,4265 (1,315-5,535) ^b	0,001
	CD8	0 (0-0) ^a	0 (0-0,074) ^a	0,324 (0,091-0,569) ^b	0,001
	Pax-5	0 (0-0) ^a	0 (0-1,075) ^a	0,025 (0-0,459) ^a	0,136
	Mac387	0 (0-0,026) ^a	0,033 (0-0,423)	0,0885 (0,021-0,448) ^b	0,013
	IgG	0 (0-0) ^a	0 (0-0) ^a	0,3688 (0,201-0,61) ^b	<0,001
	IgM	0 (0-0) ^a	0 (0-0,151) ^a	0,2715 (0,057-1,306) ^b	0,002

^{a,b}, Medianas en la misma fila con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$) según el test de Dunn.

P* Significación de Kruskal Wallis.

Para verificar estos resultados también se realizó la correlación de Spearman entre ambas variables (Tabla 33). Se observaron correlaciones entre buenas y muy buenas entre la intensidad y el tipo celular a excepción de los linfocitos B que, siendo significativa, resultó ser moderada.

Tabla 33. Correlaciones de Spearman entre intensidad de lesión y tipos celulares en testículo.

Intensidad de lesión/ tipos celulares		Rho	P*
Tipos celulares	CD3	0,917	<0,001
	CD8	0,813	<0,001
	Pax-5	0,478	0,045
	Mac387	0,718	0,001
	IgG	0,767	<0,001
	IgM	0,757	<0,001

P* Significación de correlación de Spearman

4.3.2.2.3. RELACIÓN ENTRE EL TIPO DE LESIÓN Y TIPOS CELULARES

Se comprobó que la cantidad de células inflamatorias varían en función del tipo de lesión mostrando diferencias significativas entre los grados de intensidad ($P_{K-W} < 0,05$) a excepción de las inmunoglobulinas G y M en las que no se detecta un aumento de las mismas en función del tipo de lesión que manifieste el animal. Tras analizar las diferencias entre cada tipo de lesión se observó que las medianas de las células siempre es mayor cuando la lesión es de tipo granulomatoso (Tabla 34).

Tabla 34. Medianas (mínimos – máximos) del % de área expresado por cada tipo celular según las características de lesión expresada testículo.

		Tipo de lesión			
		Ausente	Linfoplasmocitaria	Granulomatosa	P*
Tipos celulares	CD3	0 (0-0) ^a	1,156 (0,3-5,535) ^b	1,7585 (0-4,594) ^b	0,003
	CD8	0 (0-0) ^a	0,005 (0-0,569)	0,1295 (0-0,463) ^b	0,028
	Pax-5	0 (0-0) ^a	0 (0-0,156) ^a	0,2545 (0-1,075) ^b	0,014
	Mac387	0 (0-0,026) ^a	0,031 (0-0,423)	0,065 (0,025-0,448) ^b	0,013
	IgG	0 (0-0)	0 (0-0,610)	0,1005 (0-0,407)	0,136
	IgM	0 (0-0)	0,0285 (0-0,151)	0,2285 (0-1,306)	0,072

^{a,b} Medianas en la misma fila con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,005$) según el test de Dunn

P* Significación de Kruskal Wallis.

4.3.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y MOLECULAR DEL PARÁSITO Y DE SU ASOCIACIÓN CON LAS LESIONES

4.3.3.1 RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DEL PARÁSITO Y LA INTENSIDAD DE LA LESIÓN

Mediante la técnica de inmunohistoquímica no se detectó parásito en este tejido, sin embargo la qPCR detectó DNA de parásito en un animal, coincidiendo con infiltrado celular de carácter intenso.

Debido a la escasa presencia de parásito en las lesiones, como se observa en la tabla 35, y como era de esperar, no se encontró relación entre la presencia de parásito en la lesión y la intensidad de la misma ($P_{\text{Chi}^2} = 0,157$).

Tabla 35. Frecuencia de animales positivos y negativos a la detección de amastigotes por qPCR respecto a la intensidad de lesión.

		qPCR	
		Negativo	Positivo
Intensidad de lesión	Ausente	8 (44,4%)	0
	Ligera/ Moderada	6 (33,3%)	0
	Intensa	3 (16,7%)	1 (5,6%)

Por otro lado, la concordancia entre ambas técnicas fue mala, resultando un coeficiente kappa de Cohen=0 ±0, ya que el único animales detectado por qPCR no lo fue por IHQ (Tabla 36).

Tabla 36. Tabla de contingencia de la frecuencias de los resultados de qPCR y de IHQ para la detección de amastigotes de *Leishmania infantum*.

		IHQ		Total
		Negativo	Positivo	
qPCR	Negativo	17(94,4%)	0	17(94,4%)
	Positivo	1 (5,6%)	0	1 (5,6%)
	Total	18 (100%)	0	18 (100%)

Todos los resultado obtenidos quedan representados en la Tabla 9-Anexos de manera individual.

4.3.3.2 RELACIÓN ENTRE LA DETECCIÓN DEL PARÁSITO Y LOS TIPOS CELULARES

Se estudió si la presencia del parásito se relacionaba con un tipo celular en concreto. Pese a que las medianas del % de área teñida de los diferentes tipos celulares fue mayor cuando se detectó DNA de *L. infantum*, las diferencias respecto al resto de animales, no fueron estadísticamente significativas ($P_{M-W} = >0,05$, en todos los casos; Tabla 37). Respecto a los linfocitos B, cabe destacar, que fue la única célula que no se detectó en presencia de parásito.

Tabla 37. Medianas (mínimos – máximos) del % de área expresado por cada tipo celular según la intensidad de lesión expresada en testículo.

		Amastigotes qPCR		P*
		Negativo	Positivo	
Tipos celulares	CD3	0 (0-4,594)	5,535 (5,535-5,535)	0,179
	CD8	0 (0-0,463)	0,569 (0,569-0,569)	0,536
	Pax-5	0 (0-1,075)	0	0,724
	Mac387	0 (0-0,448)	0,115 (0,115-0,115)	0,285
	IgG	0 (0-0,610)	0,33060 (0,331- 0,331)	0,860
	IgM	0 (0-1,306)	0,086 (0,086-0,086)	0,425

P* Significación de Mann Whitney.

4.4. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO EN EPIDÍDIMO

4.4.1. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

4.4.1.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS LESIONES

De los 17 animales infectados, 16 (94,1%) presentaron lesiones a nivel histopatológico y 1 (5,8%) no. En el animal control no se observaron lesiones. En la Tabla 11-Anexos se describe de forma individual el estudio de las lesiones así como la puntuación clínica presentadas por cada animal infectado experimentalmente.

Respecto a la intensidad de la lesión, 8 (47,05%) presentaron lesiones de ligeras a moderadas y 8 (47,05%) intensas y respecto al tipo lesional, 3 (17,64%) se correspondieron con lesiones linfoplasmocitarias y 13 (76,4%) con lesiones predominantemente granulomatosas (Figura 27).

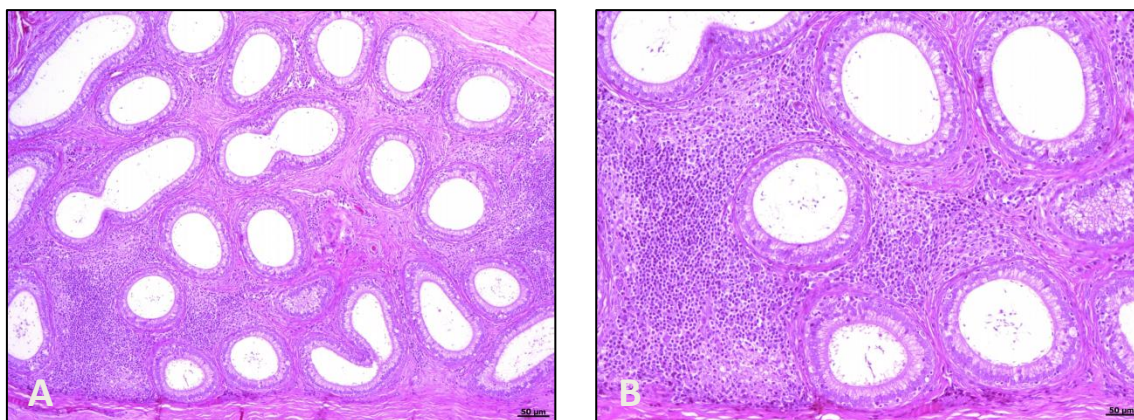


Figura 27. Epididimitis (HE). A: Inflamación de carácter intenso 50x. B Detalle de inflamación de tipo linfoplasmocitaria y granulomatosa 100x.

4.4.1.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS LESIONALES Y DE SU RELACIÓN CON EL ESTADO CLÍNICO Y ESTADO SEROLÓGICO

4.4.1.2.1 RELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD Y TIPO DE LAS LESIONES

Los resultados estadísticos mostraron la relación entre el tipo de lesión y la intensidad de la misma ($P_{\text{Chi}^2} < 0,002$). Se observó un mayor número de animales con lesión granulomatosa, tanto en lesiones de carácter ligero/moderado como en lesiones de carácter intenso, siendo ligeramente mayor cuando la lesión era de carácter intenso (35,3% y 41,2% respectivamente). Sin

embargo, cuando la lesión era de tipo linfoplasmocitario, la intensidad de lesión en los animales era principalmente ligera/moderada.

Tabla 38. Tabla de contingencia con la frecuencia de animales según el tipo de lesión y la intensidad de la misma en epidídimo.

		Tipo de lesión			
		Ausente	Linfoplasmocitaria	Granulomatosa	Total
Intensidad	Ausente	1 (5,9%)	0	0	1 (5,9%)
	Ligera/Moderada	0	2 (11,8%)	6 (35,3%)	8 (47,1%)
	Intensa	0	1 (5,9%)	7 (41,2%)	8 (47,1%)
	Total	1 (5,8%)	3 (17,6%)	13 (76,4%)	17(100%)

4.4.1.2.2 RELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD DE LA LESIÓN Y EL ESTADO CLÍNICO Y SEROLÓGICO

En este apartado se observó que ni el estado clínico de los animales ($P_{K-W} = 0, 182$) ni el estatus serológico ($P_{K-W} = 0, 472$) influyó en la intensidad de las lesiones halladas en el epidídimo

4.4.1.2.3 RELACIÓN ENTRE EL TIPO LESIONAL Y EL ESTADO SEROLÓGICO

Al igual que en el testículo, cuando la lesión es de tipo linfoplasmocitaria, la mediana de los anticuerpos es mayor que cuando la lesión es de tipo granulomatosa, es decir, existe una tendencia a mayor presencia de anticuerpos con lesiones en las que predominan los linfocitos ($P_{K-W} = 0,443$) (Tabla 39). Sin embargo, estadísticamente no se encuentran diferencias significativas entre ausencia o presencia de lesión, ni con el tipo, ya sea linfoplasmocitaria o granulomatosa.

Tabla 39. Mediana (mínimo – máximo) del %RIPC de ELISA de los animales según el tipo de lesión expresada en epidídimo.

		Tipo de lesión		
		Ausente	Linfoplasmocitaria	Granulomatosa
%RIPC ELISA		2,05(2,05-2,05)	5 (2,66-7,04)	3,73 (1,09-6,58)
				P^*

P^* Significación según Kruskal Wallis

4.4.2 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

4.4.2.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS TIPOS CELULARES

De los 16 animales con lesiones, el estudio inmunohistoquímico reveló la presencia de linfocitos T CD3 en el 100% de los animales y su distribución en la lesión fue multifocal o difusa,

especialmente en áreas de infiltrado inflamatorio intenso. (Figura 28). Estos linfocitos también se observaron intraepitelialmente, especialmente en las zonas más basales del epitelio.

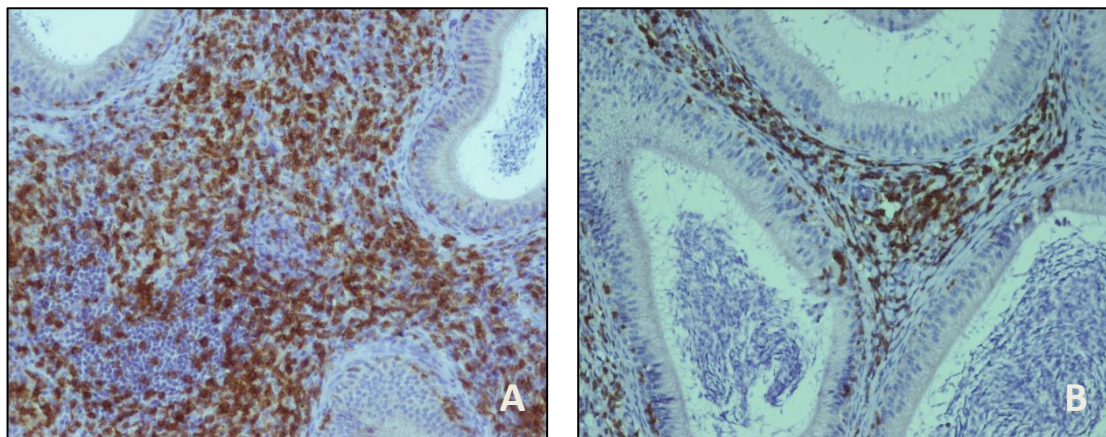


Figura 28 Imágenes de Linfocitos T CD3 detectados por Inmunohistoquímica en epidídimo. A: presencia de CD3 en lesión de carácter intenso. 200x. B: presencia de CD3 en lesión de carácter moderado. 200x.

Los linfocitos T citotóxicos CD8 se encontraron en el 87,5% (14/16) de las lesiones y asociados a áreas de infiltrado inflamatorio tanto moderado como intenso (Figura 29).

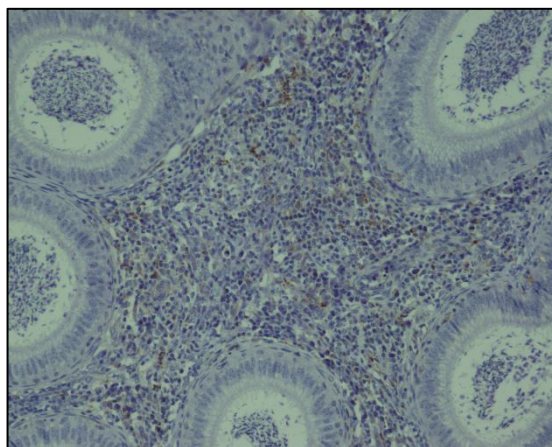


Figura 29. Imagen de Linfocitos T CD8 detectados por Inmunohistoquímica en epidídimo en infiltrado inflamatorio intenso. 200x.

Los linfocitos B se detectaron en un 93,8% (15/16) de las lesiones que, al igual que los linfocitos T se encontraron de forma multifocal y difusa con intensidad variable (Figura 30). No se detectaron intraepitelialmente.

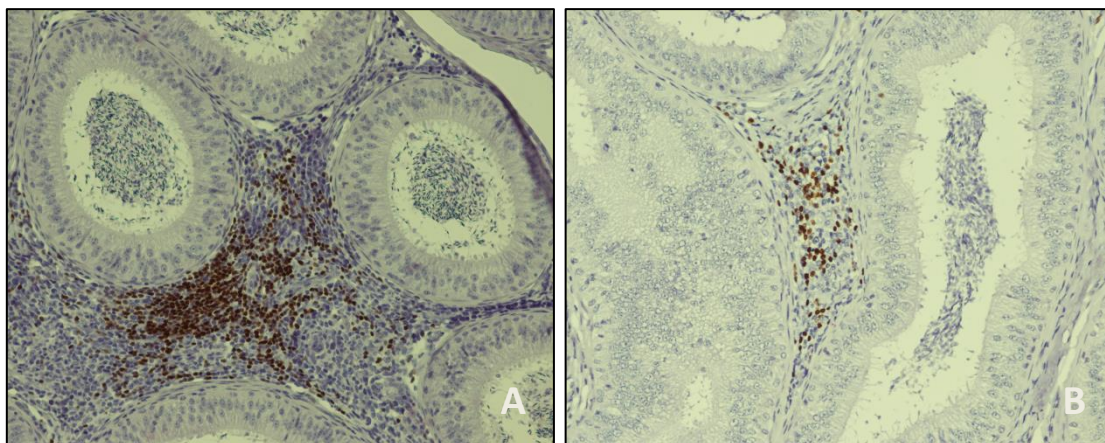


Figura 30. Imágenes de Linfocitos B detectados por Inmunohistoquímica en epidídimo. A: presencia de linfocitos B en lesión de carácter intenso. 200x. B: presencia de linfocitos B en lesión de carácter ligero. 200x.

Respecto al estudio de las inmunoglobulinas: las IgG se encontraron en un 81,3% (13/16) sobre todo en animales con intensidad de lesión muy intensa. Del mismo modo las IgM también se detectaron en un 81,3% (13/16) no siempre coincidiendo con la presencia de IgG en los focos de inflamación. No se detectaron IgA (Figura 31).

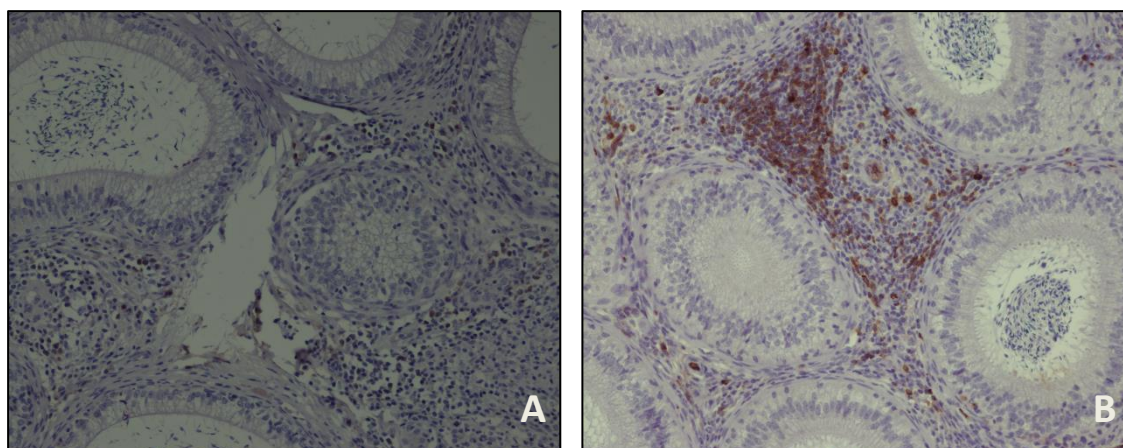


Figura 31. Imágenes de las células plasmáticas detectados por Inmunohistoquímica en epidídimo. A : presencia de IgG en lesión de carácter Intenso. 200x. B: presencia de IgM en lesión de carácter Intenso. 200x.

Los macrófagos se detectaron en un 87,5% (14/16) de los animales. Asociados, mayoritariamente, a áreas de infiltrado intenso de forma focal o multifocal (Figura 32).

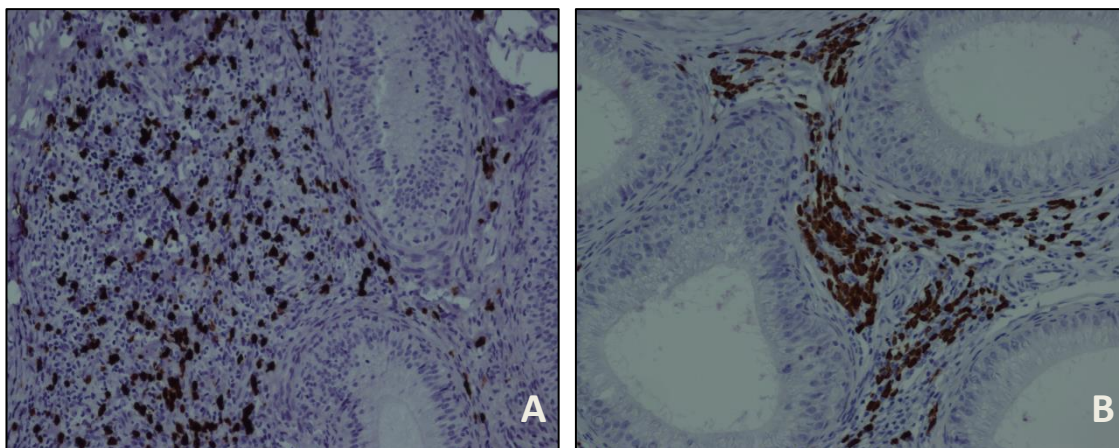


Figura 32. Imágenes de macrófagos detectados por Inmunohistoquímica en epidídimo. A: presencia de macrófagos en lesión de carácter Intenso. 200x. B: presencia de macrófagos lesión de carácter moderado. 200x.

En el animal sin lesiones en epidídimo no se observó ninguna célula inflamatoria ni inmunoglobulinas mediante IHQ.

4.4.2.2 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS TIPOS CELULARES Y SU RELACIÓN CON LA INTENSIDAD Y EL TIPO DE LESIÓN

4.4.2.2.1 RELACIÓN ENTRE LOS TIPOS CELULARES

En la Tabla 12-Anexos se muestran todos los resultados arrojados por Image J, incluyendo el animal control negativo y el perro sin lesión.

Los resultados obtenidos nos permitieron valorar la relación entre los distintos tipos celulares presentes en las lesiones. Como se observa en la Tabla 40 está osciló entre mala (-0,014) y muy buena (0,807).

Tabla 40. Correlación de Spearman entre los tipos celulares en epidídimo.

	Rho	P
CD3 - CD8	0,459	0,064
CD3 - PAX5	0,597*	0,011
CD3 - MAC387	0,52	0,032
CD8 - MAC387	0,315	0,218
CD3 - IgG	0,668	0,003
CD3 - IgM	0,508	0,037
Pax5 - MAC387	0,014	0,959
Pax5 - IgG	0,750	0,001
Pax5 - IgM	0,807	<0,001
Mac387 - IgG	0,274	0,286
Mac387 - IgM	-0,014	0,959
IgG - IgM	0,491	0,045

P* Significación de correlación de Spearman

4.4.2.2.2 RELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD DE LA LESIÓN Y TIPOS CELULARES

En este estudio se observó que solo los linfocitos T CD3 y CD8 aumentaban significativamente en relación a la intensidad de la lesión ($P_{K-W} = 0,016$ y $P_{K-W} = 0,03$, respectivamente) (Tabla 41). Además, entre ellos también mostraban una buena correlación con la intensidad. Respecto al resto de células, aunque sus medianas aumentaban con la intensidad de la lesión, este aumento no fue significativo. Entre estas, los macrófagos fueron las células que mostraron una mejor relación con la intensidad (Tabla 42).

Tabla 41. Mediana (mínimo – máximo) del % de área expresado por cada tipo celular según la intensidad de lesión expresada en epidídimo.

		Intensidad de la lesión			
		Ausente	Ligera/Moderada	Intensa	P*
Tipos celulares	CD3	0 (0-0) ^a	0,974 (0,137-3,135) ^a	5,422 (0,285-18,468) ^b	0,016
	CD8	0 (0-0)	0,1695 (0-0,455) ^a	0,312 (0,193-1) ^b	0,030
	Pax-5	0 (0-0) ^a	0,7585 (0-3,29) ^a	1,696 (0,05-7,255) ^a	0,239
	Mac387	0 (0-0) ^a	0,364 (0-3,708) ^a	2,195 (0,686-7,221) ^a	0,079
	IgG	0 (0-0) ^a	0,235 (0-0,582) ^a	0,484 (0-1,591) ^a	0,150
	IgM	0 (0-0) ^a	0,275 (0-2,753) ^a	0,7335 (0-6,657) ^a	0,293

^{a,b} Medianas en la misma fila con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,005$) según Dunn test.

P* Significación de Kruskal Wallis.

Tabla 42. Correlaciones de Spearman entre intensidad de lesión y tipos celulares en epidídimo

Intensidad de lesión/ tipos celulares		Rho	P*
Tipos celulares	CD3	0,715	0,001
	CD8	0,660	0,004
	Pax-5	0,335	0,189
	Mac387	0,550	0,022
	IgG	0,468	0,058
	IgM	0,336	0,188

P* Significación de correlación de Spearman

4.4.2.2.3 RELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD DE LA LESIÓN Y TIPOS CELULARES

Se comprobó que la cantidad de células inflamatorias, en general, no variaba en función del tipo lesional. Tras analizar las diferencias de forma individual se observó que las medianas de los Linfocitos T CD8, Linfocitos B y de las IgM eran mayores cuando la lesión es de tipo linfoplasmocitario. Por el contrario, las medianas de los linfocitos T y de los macrófagos eran mayores cuando la lesión era de tipo granulomatosa. En el caso de las IgG la mediana era prácticamente en ambos tipos de inflamación. Estadísticamente, solo se encontraron diferencias significativas en los macrófagos, los cuales aparecían en mayor cantidad en lesiones granulomatosas. Como se observa en la Tabla 43 ningún animal sin lesión presentó ningún tipo celular a estudio.

Tabla 43. Mediana (mínimos – máximos) del % de área expresado por cada tipo celular según el tipo de lesión expresado en epidídimo.

		Tipos de lesión			
		Ausente	Linfoplasmocitaria	Granulomatosa	P*
Tipos celulares	CD3	0 (0-0)	0,747 (0,562-5,681)	2,727 (0,137-18,468)	0,224
	CD8	0 (0-0)	0,334 (0-0,455)	0,22 (0-1)	0,338
	Pax-5	0 (0-0)	1,351 (0,911-3,29)	0,737 (0-7,255)	0,218
	Mac387	0 (0-0)	0 (0-0,686) ^a	2,315 (0,059-7,221) ^b	0,032
	IgG	0 (0-0)	0,32 (0,043-0,466)	0,375 (0-1,591)	0,377
	IgM	0 (0-0)	1,804 (0,153-2,753)	0,378 (0-6,657)	0,251

^{a,b}, Medianas en la misma fila con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,005$) según el test de Dunn

P* Significación de Kruskal Wallis.

4.4.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRESENCIA DEL PARÁSITO EN LA LESIÓN

4.4.3.1 RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DEL PARÁSITO Y LA INTENSIDAD DE LA LESIÓN

Mediante IHQ, el parásito se detectó en un 18,8% (3/16) de los animales encontrándose tanto en lesiones ligeras/moderadas como intensas, sin diferencias significativas ($P_{\text{Chi}^2} = 0,720$). (Figura 33). No se detectaron parásitos en los animales control ni en los animales infectados pero sin lesión.

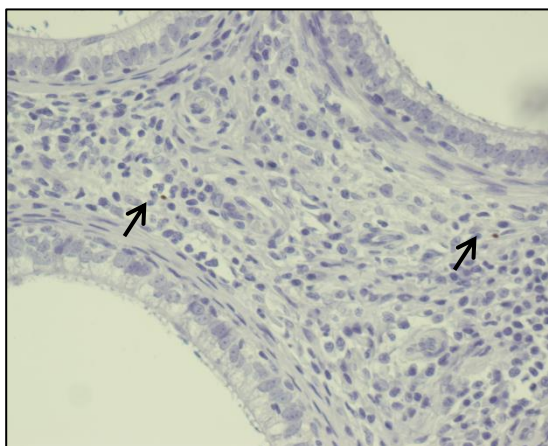


Figura 33. Imagen de amastigotes detectados por Inmunohistoquímica en epidídimo en lesión de carácter Intenso. Las flechas señalan los amastigotes. 400x.

Mediante la qPCR se detectó DNA de *Leishmania* en un 37,5% de los animales con lesión (6/16). De forma similar a la IHQ, se detectó el parásito en lesiones de intensidad ligera/moderada e intensa, sin diferencias significativas ($P_{\text{Chi}^2} = 0,011$)

La técnica de qPCR resultó más sensible que la IHQ ya que detectó mayor número de animales positivos a *Leishmania*. Además los tres animales detectados por IHQ también lo fueron por qPCR. (Tabla 13-Anexos). Así que, la concordancia obtenida entre ambas pruebas fue buena, resultando el coeficiente de Kappa de Cohen en moderada: $\text{Kappa} = 0,564 \pm 0,206$. (Tabla 44).

Tabla 44. Tabla de contingencia de las frecuencias de los resultados de qPCR y de IHQ para la detección de amastigotes de *Leishmania infantum* en epidídimo.

		IHQ		Total
		Negativo	Positivo	
qPCR	Negativo	11 (64,7%)	0	23 (82,1%)
	Positivo	3 (17,6%)	3 (17,6%)	5 (17,9%)
Total		14 (82,4%)	3 (17,6%)	17 (100%)

4.4.3.2 RELACIÓN ENTRE LA DETECCIÓN DEL PARÁSITO Y LOS TIPOS CELULARES

Los resultados obtenidos sugieren que no existe relación entre la presencia de parásito en la lesión y la cantidad de tipos celulares detectados en la misma. No se encontraron diferencias significativas por ninguna de las dos técnicas de detección ($P_{M-W} > 0,05$ en todos los casos)). Además, observando las medianas del % de área teñida se confirmó que los tipos celulares no aumentan en presencia de parásito. (Tabla 45 y 46)

Tabla 45. Mediana (mínimo – máximo) del % de área expresado por cada tipo celular según la presencia y ausencia de parásito detectado mediante qPCR en epidídimo.

		Amastigotes qPCR		P*
		Negativo	Positivo	
Tipos celulares	CD3	2,139 (0,137-18,468)	1,964 (0-5,847)	0,733
	CD8	0,215 (0-1)	0,2595 (0-0,713)	0,808
	Pax-5	0,78 (0-7,255)	0,530 (0-0,481)	0,404
	Mac387	2,315 (0-7,221)	0,9345 (0-6,287)	0,591
	IgG	0,282 (0-1,591)	0,3475 (0-0,639)	0,884
	IgM	0,4 (0-6,171)	0,2465 (0-6,657)	0,808

P* Significación de Mann Whitney.

Tabla 46. Mediana (mínimo – máximo) del % de área expresado por cada tipo celular según la presencia y ausencia de parásito detectado mediante IHQ en epidídimo.

		Amastigotes IHQ		P*
		Negativo	Positivo	
Tipos celulares	CD3	1,7895 (0-18,468)	2,727 (1,201-5,847)	0,591
	CD8	0,239 (0-1)	0,22 (0,045-0,713)	0,859
	Pax-5	0,7585 (0-7,255)	2,309 (0,149-2,481)	0,768
	Mac387	1,629 (0-7,221)	1,472 (0,5-6,287)	0,676
	IgG	0,235 (0-1,591)	0,582 (0,375-0,639)	0,197
	IgM	0,286 (0-6,171)	0,378 (0-6,657)	0,859

P* Significación de Mann Whitney.

4.5 ESTUDIO DE NGAL COMO BIOMARCADOR DE DAÑO RENAL CRÓNICO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR *LEISHMANIA INFANTUM*

4.5.1 ESTUDIO BIOQUÍMICO

4.5.1.1 CÁLCULO DEL UPC Y CREATININA SÉRICA

Los resultados recibidos por Laboratorios Albéitar de proteína total urinaria y creatinina urinaria se utilizaron para el cálculo de UPC de cada animal: Proteína total/ Creatinina

Respecto a la creatinina sérica, como puede apreciarse en la gráfica, ningún animal estuvo por encima de 1,4mg/dL, con lo que no se consideró ningún animal azotémico (Figura 34).

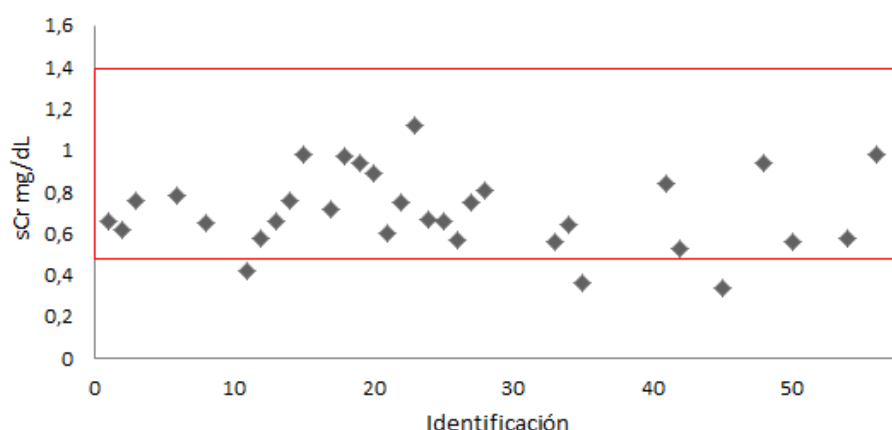


Figura 34. Creatinina sérica (sCr mg/dL) de cada animal (Identificación). La caja roja corresponde al intervalo de referencia Valor de referencia 0,5-1,4

4.5.1.2. CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE NGAL Y DEL RATIO NGAL URINARIO/CREATININA (UNC)

Una vez obtenidos los datos tras la realización del ELISA, se calculó el ratio UNC dividiendo la concentración de NGAL obtenida en mg/dL entre la creatinina urinaria, dato con que se trabajó para valorar dicho biomarcador.

Así pues, en base a los valores de UPC y creatinina sérica (según IRIS 2015), y basándonos en la clasificación de García Martínez (2015), los animales quedaron distribuidos de la siguiente manera: 5 animales en Grupo 1, nueve en Grupo 2, 18 en Grupo 3 y ninguno en Grupo 4 (Tablas 14 y 15-Anexos).

A modo recordatorio, el Grupo 1 se corresponde con animales no proteinúricos y no azotémicos, el Grupo 2 con animales con proteinuria borderline y no azotémicos, el Grupo 3 con animales proteinúricos y no azotémicos y el Grupo 4 con animales proteinúricos y azotémicos.

4.5.1.3. ANÁLISIS COMPARATIVO PARA LA EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA NGAL EN BASE A LOS HALLAZGOS BIOQUÍMICOS

En primer lugar se valoró la distribución de los datos a estudio (UPC y UNC) que, en ambos casos resultó no ser normal ($P_{K-S} > 0,05$), con lo que se realizaron pruebas no paramétricas para el estudio de ambos marcadores.

Se comprobó que la concentración tanto de UPC como de UNC varía en función de la gravedad de la disfunción renal valorada según proteinuria y azotemia. Además, se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos como se observa en la Tabla 47.

Tabla 47 . Medianas (mínimos y máximos) de UPC y UNC en función de los grupos IRIS.

Grupo IRIS	N	UPC	UNC
1	5	0,174 (0,117-0,193) ^a	0,002 (0,002-0,018) ^a
2	9	0,250 (0,216-0,462) ^a	0,170 (0,005-1,462) ^b
3	18	1,312 (0,603-2,964) ^b	0,390 (0,006-3,043) ^b
	P*	<0,001	0,001

^{a-b}Medianas en la misma columna con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$) según el test de Dunn.

P* Significación según Kruskal-Wallis.

Así pues, respecto a los valores de UPC, el Grupo 3 mostró diferencias significativas entre el Grupo 1 y el Grupo 2 ($P < 0,001$ en ambos casos), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el Grupo 1 y Grupo 2 ($P = 0,181$).

En cambio, respecto a los valores de UNC, se encontraron diferencias significativas entre el Grupo 1 y el Grupo 2 ($P = 0,024$) (Figura 35).

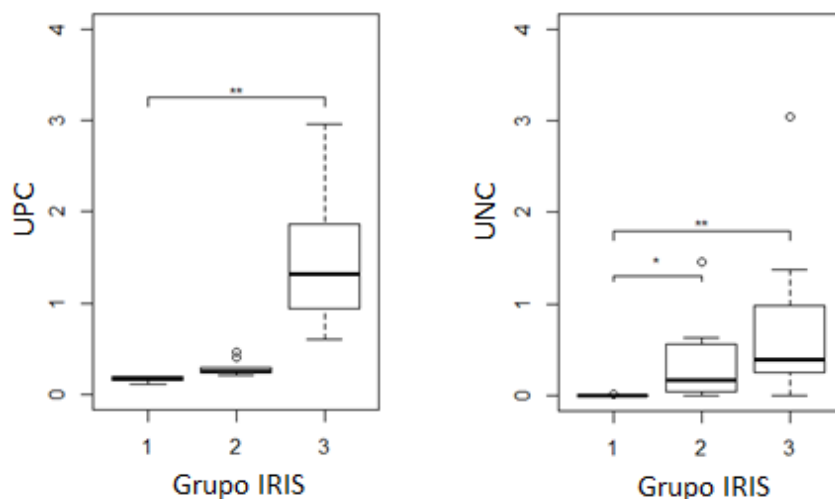


Figura 35. UPC y UNC en los diferentes grupos de IRIS. La gráfica muestra la mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran la significación siendo: * $P<0,05$ ** $P<0,01$

Esto quiere decir que el UPC diferencia bien los animales a partir de daño renal avanzado (animales proteinúricos y no azotémicos). Sin embargo, UNC es capaz de diferenciar animales sin proteinuria de animales con proteinuria de carácter leve (borderline), o lo que es lo mismo, UNC detecta eficazmente animales con daño renal incipiente.

4.5.2 ESTUDIO HISTOLÓGICO

4.5.2.1 HALLAZGOS HISTOLÓGICOS

En este estudio se partió de dos animales menos (ID 14 y 48) debido a que ambos casos hubo problemas con su valoración histológica. Así pues, esta parte del estudio se realizó con 30 animales, quedando 13 machos y 17 hembras.

Tras la evaluación de las muestras a estudio se observaron 25 animales con glomerulonefritis y cinco sin lesiones glomerulares. Once de ellos mostraron glomerulonefritis de tipo membranoproliferativa y 14 mesangioproliferativa. En ninguno de ellos se observaron lesiones de glomeruloesclerosis (Figuras 36 y 37).

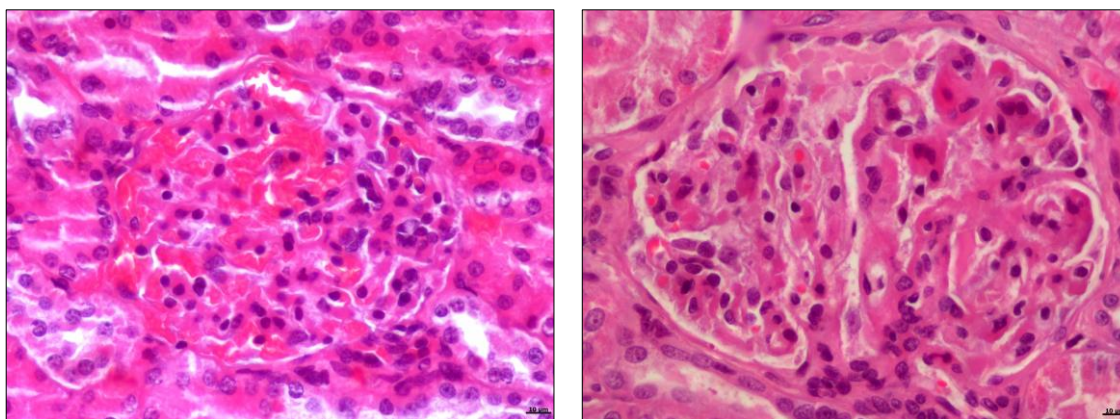


Figura 36. Imagen de glomerulonefritis de tipo membranoproliferativa (HE) A: glomerulonefritis membranoproliferativa difusa, 400x. B: glomerulonefritis membranoproliferativa segmental, 400x.

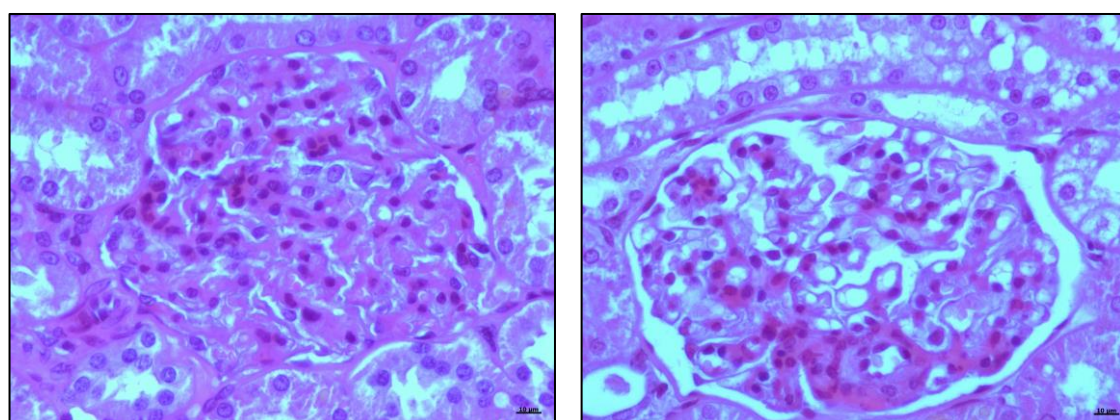


Figura 37. Glomerulonefritis de tipo mesangioproliferativa (HE) A: glomerulonefritis mesangioproliferativa con adherencias en la cápsula de Bowman, 400x. B: glomerulonefritis mesangioproliferativa con degeneración tubular, 400x.

Respecto a las lesiones intersticiales, estas se caracterizaron por una leve nefritis intersticial mononuclear, principalmente localizada en la región medular y junto a vasos, que se observó en quince animales. Solo algunos perros mostraron proteína intratubular, sin embargo, no se encontraron lesiones tubulares evidentes ni fibrosis intersticial.

Según el número de glomérulos afectados, cinco animales quedaron clasificados en el Grupo Grado 1, 14 en el Grupo Grado 2 y 11 en el grupo Grado 3. En la Tabla 48 se observa la distribución de los animales y sus frecuencias en función del grado de lesión y la presencia o ausencia de nefritis intersticial

Tabla 48. Número y frecuencia de animales en función del grado de lesión subdivididos en animales con o sin nefritis intersticial.

Grupo	Con nefritis intersticial	Sin nefritis intersticial	Total
Grado 1	0	5 (100%)	5
Grado 2	8 (57%)	6 (42%)	14
Grado 3	7 (63%)	4 (36%)	11
Total	15	10	30

Así pues, cinco animales no presentaron glomerulonefritis, con lo que se clasificaron como normales o Grupo 1. En el Grupo 2, con menos del 50% de los glomérulos afectados, 8 de ellos (57%) presentaron nefritis intersticial y 6 (42%) no. Y, por último, en el Grupo 3 con más del 50% de los glomérulos afectados, 7 (63%) presentaron nefritis intersticial y 4 (36%) no. Debido al carácter leve de la nefritis intersticial, esta lesión no se tuvo en cuenta en los análisis estadísticos.

Todos los datos arrojados por el estudio histológico quedan resumidos en esta Tabla 16-Anexo

Teniendo en cuenta el tipo de glomerulonefritis, cinco perros con glomerulonefritis mesangioproliferativa quedaron clasificados en el Grupo Grado 1, nueve en el Grupo Grado 2 y cinco en el Grupo Grado 3. Por otro lado, respecto a la glomerulonefritis membranoproliferativa, cinco animales se incluyeron en el Grupo Grado 1, cinco en el Grupo Grado 2 y seis en el Grupo Grado 3.

4.5.3. ANÁLISIS COMPARATIVO PARA LA EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA NGAL EN BASE A LOS HALLAZGOS HISTOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

Según los parámetros bioquímicos, tanto el UPC como el UNC varían en función del grado de lesión glomerular valorada por histología. Además se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos como se observa en la Tabla 49, diferenciando bien el daño entre los animales sin lesión y con lesión, en ambos casos.

Tabla 49. Medianas (mínimos y máximos) de UPC y UNC en función de los grupos de grado de lesión glomerular (histología)

Grupo Grado	N	UPC	UNC
1	5	0,174 (0,117-0,242) ^a	0,002 (0,002-0,051) ^a
2	14	0,858 (0,193-2,824) ^b	0,249 (0,005-3,043) ^b
3	11	0,984 (0,251-2,964) ^b	0,539 (0,006-1,462) ^b
	P*	<0,001	

^{a-b} Medianas en la misma columna con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$) según el test de Dunn..

P^* Significación según Kruskal-Wallis.

Sin embargo, se observó mayor variabilidad dentro de cada grupo en los valores de UPC en comparación a los valores de UNC. Además, la mediana en los Grupos Grado 2 y 3 cuando se valora el UPC, es prácticamente la misma (0,858 y 0,984 respectivamente). Por otro lado, las medianas de los valores cuando se valoró el UNC aumentaron de manera progresiva como puede observarse en la Figura 38.

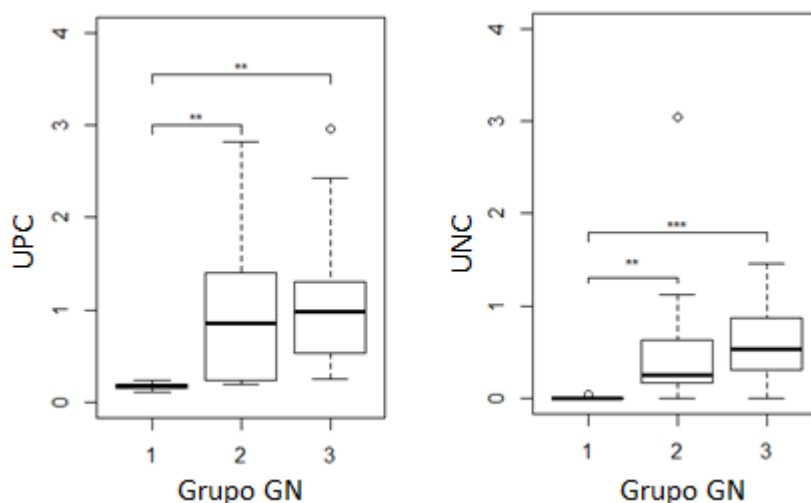


Figura 38. UPC y UNG en los diferentes grupos intensidad de glomerulonefritis. La gráfica muestra la mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p siendo: ** $P < 0,01$ *** $P < ,.001$

Considerando el tipo de glomerulonefritis y el grado de lesión de la misma, cuando se realizó el análisis de los animales con glomerulonefritis de tipo membranoproliferativa se observó que tanto UPC como UNC mostraron diferencias significativas entre los grupos (Tabla 50).

Tabla 50. Medianas (mínimos y máximos) de UPC y UNC en función de los grupos de grado de lesión glomerular en los animales con lesión membranoproliferativa.

Grupo Grado	N	UPC	UNC
1	5	0,174 (0,117-0,242) ^a	0,002 (0,002-0,051) ^a
2	5	1,397 (0,216-2,824) ^b	0,250 (0,007-0,636) ^b
3	6	0,824 (0,294-2,429) ^b	0,443 (0,148-1,048) ^b
	P*	0,015	0,008

^{a-b} Medianas en la misma columna con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$) según el test de Dunn.

P^* Significación según Kruskal-Wallis.

Sin embargo, la mediana del Grupo Grado 2 con los valores de UPC, resultó mayor que la mediana en el Grupo Grado 3 (1,397 y 0,824, respectivamente). Esto quiere decir que el UPC arroja valores mayores cuando la lesión en el glomérulo (de tipo membranoproliferativa) es leve, de forma que no aumenta de manera progresiva con la gravedad de la misma.

En cambio, cuando el estudio se realiza con los valores de UNC se observa un aumento de la mediana de manera progresiva entre los diferentes grupos, en concordancia con el aumento de la lesión (Figura 39).

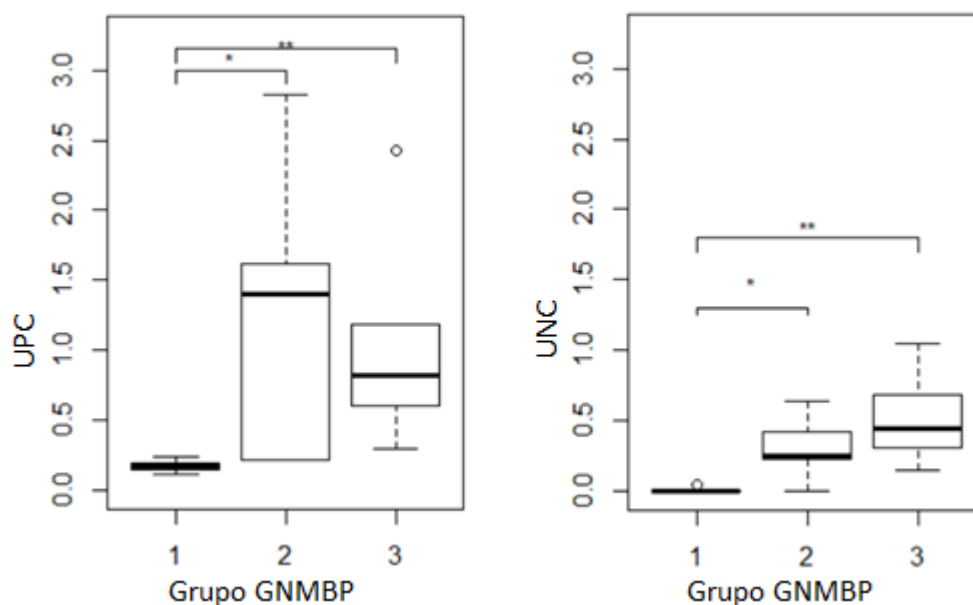


Figura 39. UPC y UNG en los diferentes grupos de intensidad de glomerulonefritis de tipo membranoproliferativa (GNMBP). La gráfica muestra la mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras).

Los asteriscos muestran el valor de P siendo: * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

Estos resultados sugieren que el UNC es capaz de detectar la glomerulonefritis cuando esta es de tipo membranoproliferativa. Por otro lado, se sugiere la ineficacia del UPC para marcar este tipo de lesión.

Cuando se trata de glomerulonefritis de tipo mesangioproliferativa, también se detectan diferencias significativas entre los grupos, tanto cuando se tratan los valores de UPC como los valores de UNC. Además, en ambos casos el aumento de la mediana de los valores es progresivo.

Tabla 51. Medianas (mínimos y máximos) de UPC y UNC en función de los grupos de grado de lesión glomerular en el los animales con lesión mesangioproliferativa.

Grupo Grado	N	UPC	UNC
1	5	0,174 (0,117-0,242) ^a	0,002 (0,002-0,051) ^a
2	9	0,778 (0,193-2,508) ^b	0,248 (0,005-3,043) ^b
3	5	1,035 (0,251-2,964) ^b	0,557 (0,006-1,462) ^b
P*		0,009	0,011

^{a-b}Medianas en la misma columna con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$) según el test de Dunn.

P^* Significación según Kruskal-Wallis.

Sin embargo, como se observa en la Figura 40, la variabilidad de los valores de UNC fue menor en cada grupo que la observada en UPC, lo que sugiere nuevamente, que el marcador a estudio es más robusto que el UPC.

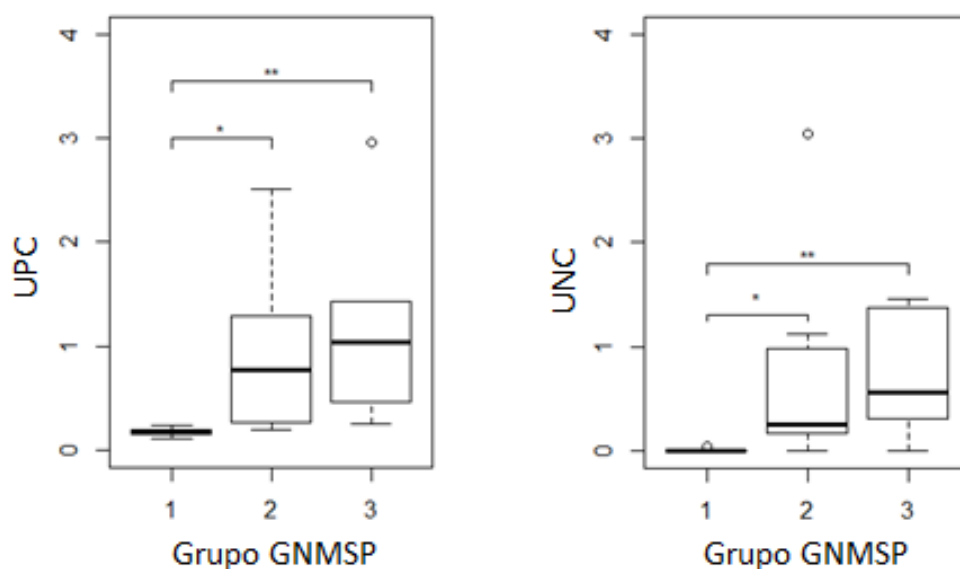


Figura 40. UPC y UNG en los diferentes grupos de intensidad de glomerulonefritis de tipo mesangioproliferativa (GNMSP). La gráfica muestra la mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de P siendo: * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

4.5.4 RELACIÓN ENTRE LA INFLAMACIÓN DE TEJIDO MUSCULAR Y REPRODUCTOR MASculINO CON EL DAÑO RENAL DETECTADO MEDIANTE HISTOLOGÍA.

Con el fin de relacionar la inflamación observada en los diferentes tejidos motivo de estudio con la lesión renal, se escogieron los animales de los que se obtuvieron todos los datos.

Así pues, para valorar la relación entre la glomerulonefritis y la miositis del músculo temporal se escogieron 25 animales, mientras que para relacionarla con las lesiones reproductivas se escogieron los machos, siendo un total de 16 animales.

Tras el análisis se observó que esta relación sólo es estadísticamente significativa entre la intensidad lesional en epidídimo y el grado de glomerulonefritis. ($P_{\text{Chi}^2} = 0,023$). Como puede observarse en la Tabla 52, solo un animal presentaba lesión en epidídimo en ausencia de glomerulonefritis.

Tabla 52. Tabla de contingencia entre grado de glomerulonefritis e intensidad de lesión en epidídimo.

		Glomerulonefritis			Total
		Ausente	< 50%	>50%	
Lesión Epidídimo	Ausente	3 18,8%	0	0	3 18,8%
	Ligera/Moderada	1 6,3%	4 25,0%	3 18,8%	8 50,0%
	Intensa	0	3 18,8%	2 12,5%	5 31,3%
	Total	4 25,0%	7 43,8%	5 31,3%	16 100,0%

Respecto al tejido muscular y testicular, no se observó relación con el daño renal detectado ($P_{\text{Chi}^2} = 0,076$ y $P_{\text{Chi}^2} = 0,403$, respectivamente). Se observan animales tanto sin lesión muscular como sin lesión en testículo, que presentan lesión glomerular (Tablas 53 y 54).

Tabla 53 Tabla de contingencia con las frecuencias relativas de los animales en función de la lesión muscular y glomerular.

		Glomerulonefritis			TOTAL
		Ausente	< 50%	>50%	
Lesión Muscular	Ausente	4 (16%)	4 (16%)	1 (4%)	9 (36%)
	Ligera/Moderada	1 (4%)	6 (24%)	3 (12%)	10 (40%)
	Intensa	0	2 (8%)	4 (16%)	6 (24%)
	TOTAL	5 (20%)	12 (48%)	8 (32%)	25 (100%)

Tabla 54. Tabla de contingencia con las frecuencias relativas de los animales en función de la lesión testicular y glomerular.

		Glomerulonefritis			Total
		Ausente	< 50%	>50%	
Lesión Testículo	Ausente	4 (25%)	3 (18,8%)	3 (18,8%)	10 (62,5%)
	Ligera/Moderada	0	3 (18,8%)	1 (6,3%)	4 (25,0%)
	Intensa	0	1 (6,3%)	1 (6,3%)	2 (12,5%)
	Total	4 (25%)	7 (43,8%)	5 (31,3%)	16 (100,0%)

4.5.5 RELACIÓN ENTRE LA INFLAMACION EN TEJIDO MUSCULAR Y RESPRODUCTOR MASCULINO CON LA DETECCIÓN DE NGAL EN ORINA

Debido a que el NGAL puede proceder de la inflamación, en el presente trabajo se estudió la posible relación entre la intensidad lesional de los diferentes tejidos a estudio con la cantidad de NGAL (mg/dL) detectada en orina. El propósito de este estudio era intentar descartar que el NGAL detectado en orina fuese solo de origen glomerular.

En primer lugar, respecto al tejido muscular, tras el análisis de los resultados no se observaron diferencias significativas de la concentración de NGAL con la intensidad de la miositis ($P_{K-W}=0,068$).

Además, como se observa en la Tabla 55 las medianas de NGAL no aumentan progresivamente con la intensidad de la lesión, confirmado así que el NGAL detectado en orina no está asociado al daño muscular.

Tabla 55. Medianas (mínimos y máximos) de NGAL (mg/dL) en función de los grupos intensidad de lesión muscular

Intensidad lesión	N	NGAL (mg/dL)
Ausente	10	16,06 (0,20-58,18)
Ligera/Moderada	10	55,705 (0,20-73,78)
Intensa	6	52,43 (24,49-65,63)
P^*		0,068

P^* Significación según Kruskal-Wallis

Respecto a la inflamación detectada en testículo, pese a que la mediana de NGAL parece aumentar cuando la lesión en dicho tejido es de carácter intenso, la dispersión de los datos es tan grande que esta diferencia no se puede considerar estadísticamente significativa ($P_{K-W} = 0,302$) (Tabla 56).

Tabla 56. Medianas (mínimos y máximos) de NGAL (mg/dL) en función de los grupos de intensidad de lesión testicular

Intensidad lesión	N	NGAL mg/dL
Ausente	11	48,99 (0,2-71,71)
Ligera/Moderada	4	49,04 (20,52-73,78)
Intensa	2	60,48 (55,33-65,63)
	P*	0,302

P* Significación según Kruskal-Wallis

Finalmente, al relacionar la inflamación en el epidídimo con la cantidad de NGAL en orina, se observó que la mediana de esta proteína aumenta en presencia de lesión, sin embargo, al igual que en testículo, los datos son tan dispersos que no se observan diferencias significativas entre los grupos de lesión ($P_{K-W} = 0,202$) (Tabla 57).

Tabla 57. Medianas (mínimos y máximos) de NGAL (mg/dL) en función de los grupos de intensidad de lesión en epidídimo

Intensidad lesión	N	NGAL mg/dL
Ausente	11	4,84 (0,2- 58,18)
Ligera/Moderada	4	52,16 (0,2-73,78)
Intensa	2	53,11 (20,52-73,59)
	P*	0,202

P* Significación según Kruskal-Wallis

5. DISCUSIÓN

5.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN Y ELECCIÓN DE LA PRUEBA SEROLÓGICA

El diagnóstico clínico, serológico y parasitológico se llevó a cabo en todos los animales para verificar el éxito de la infección experimental, valorando por una parte, la presencia del parásito en diversos tejidos y por otra, el desarrollo de la sintomatología clínica. Además, estos resultados sirvieron para compararlos con el resto de estudios con el objeto de contribuir al conocimiento de la patogénesis de la leishmaniosis.

5.1.1 ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS

Pese a realizar el estudio en animales de la misma raza y de la misma edad, en el presente trabajo se encontró gran variabilidad de signos clínicos. La media respecto a la puntuación clínica total (PC) registrada entre todos los animales fue baja (3,3 de un total de 12 puntos). De hecho, solo un perro (ID=9) registró una PC elevada, con valoración de 11 puntos, seguido de dos animales (ID=10 y 51), con una puntuación de 10 en ambos casos. Estos hallazgos son debidos principalmente a que, por razones éticas, ningún animal se mantuvo en condiciones clínicas graves (RD: 53/2013).

Respecto a los signos clínicos observados, el más frecuente fue la linfadenopatía de los nódulos linfáticos poplíteos, que aparecieron en el 53,7% de los animales, seguida de signos cutáneos y pérdida de peso, que fueron registrados en ambos casos en el 50% de los animales. Estos resultados están en concordancia con el estudio experimental de Rodríguez-Cortés *et al.* (2007), en el cual los signos expresados con mayor frecuencia fueron también la linfadenopatía y las alteraciones cutáneas.

Cuando los animales se clasificaron en función del número de signos clínicos obtuvimos un alto porcentaje de animales asintomáticos (38,8%) en contraposición a lo encontrado por Fernández-Cotrino *et al.* (2013) que, realizando la misma clasificación, obtuvo un 8% de animales sin signos asociados a *L. infantum*. Esta diferencia pudo deberse a que en el presente trabajo se realizó la misma clasificación pero con las modificaciones descritas por Molina *et al.* (1994) el cual consideraba como asintomáticos a aquellos animales con una puntuación clínica entre 0 y 1, siempre que se tratara de una linfadenopatía aislada. No obstante, ambos estudios demuestran

la alta variabilidad de signos clínicos que puede presentar la leishmaniosis canina, lo cual resulta más evidente trabajando con poblaciones homogéneas en infecciones experimentales.

5.1.2 ESTUDIO SEROLÓGICO

Los animales enfermos pueden ser diagnosticados por técnicas serológicas ya que la mayoría de los perros con síntomas muestran niveles altos de anticuerpos (Porrozi *et al.*, 2007). Actualmente, la técnica recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico serológico de la Leishmaniosis es la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Sin embargo, en los últimos años existe una tendencia a replantearse el uso de esta técnica como la prueba de referencia y, está siendo sustituida, en algunos trabajos, por la técnica de ELISA (Alvar *et al.*, 2004; Maia y Campino, 2008; Maia *et al.*, 2010). Por este motivo, en el presente trabajo se realizaron ambas técnicas tratando de valorar la mejor para el conjunto general del estudio.

Nuestros resultados arrojaron un 90,8% de animales positivos mediante la prueba de IFI y un 88,9% positivos a ELISA, a los doce meses de infección. Además, la mayoría de los perros positivos presentaron valores altos de anticuerpos. Así, de los 54 animales infectados, el 48,2% presentó titulaciones superiores a 1/160 en IFI y el 51,9% un %RIPC >4 en ELISA. Estos resultados concuerdan con el modelo experimental canino de Fernández-Cotrino *et al.* (2013), en el cual un 40% de los animales presentó títulos altos en IFI y un 48% en ELISA.

Respecto a la variabilidad en el nivel de los anticuerpos, en ambos casos fue muy amplia, obteniendo datos desde 0 a 1/1280 en la prueba de IFI y desde 0,2 a 7,04 en la prueba de ELISA. Las diferencias observadas en la magnitud de las pruebas serológicas de los perros refleja el curso patocrónico de la infección. Aunque se usó la misma raza de animales, el background genético de cada perro influye en el grado de resistencia o susceptibilidad a la infección y al desarrollo de la enfermedad. (Altet *et al.*, 2002). Además, en la leishmaniosis canina se habla de fenotipos resistentes que se caracterizan por la presencia de una baja titulación de anticuerpos, y de fenotipos susceptibles que presentan títulos de anticuerpos altos. Además, la variabilidad individual en la expresión de enfermedad es muy elevada. Mientras que unos animales presentan un curso rápido tras la infección, otros muestran pocos o ningún signo clínico.

Para completar el estudio se calcularon la concordancia y correlación entre ambas pruebas, encontrando un coeficiente de concordancia de Kappa muy bueno: $0,93 \pm 0,06$, así como una correlación de Spearman de $Rho = 0,47$. Otros autores como Mancianti *et al.* (1995) ya

demonstraron esta buena relación entre ambas pruebas encontrando, incluso, mejor correlación mediante regresión lineal de Pearson, obteniendo $r^2 = 0,865$.

5.1.3 ESTUDIO PARASITOLÓGICO

El diagnóstico de la infección siempre debe tratarse de forma diferente y la técnica de PCR puede ser un gran apoyo a la serología y muy útil cuando los títulos de anticuerpos son dudosos puesto que los perros asintomáticos suelen ser seronegativos como hemos visto anteriormente. Gran parte de los amplios rangos de sensibilidad de la PCR observados en diferentes estudios pueden ser explicados por una distribución heterogénea del parásito en cada tejido y órgano, lo que es lo mismo, la carga parasitaria asociada con el tropismo de la cepa de *Leishmania* y con la respuesta inmune local expresada por el animal (Maia *et al.*, 2007). Generalmente, para aumentar la sensibilidad del diagnóstico, se recomienda el uso de la técnica PCR a tiempo real (qPCR) en nódulo linfático, médula ósea o bazo, además de la cuantificación de anticuerpos por serología (Miró *et al.*, 2008). Es por ello que en el presente trabajo se decidió realizar esta técnica en dos órganos diana para obtener la mayor sensibilidad posible.

Tras la realización de la técnica de qPCR mediante sonda TaqMan, obtuvimos un 74,1% de animales positivos en médula respecto a un 72,2% en linfonodo. Cabe destacar en este punto, que 9 de los 54 animales infectados experimentalmente no resultaron positivos a ninguna de las dos pruebas, así que, como se ha explicado en el apartado de los resultados, se confirmó su positividad utilizando una qPCR alternativa que usa Sybr Green, resultando ser una técnica más sensible que la sonda TaqMan utilizada por nosotros, pero menos específica. Esta mayor especificidad de la qPCR que hace uso de la sonda TaqMan ha sido ya descrita previamente por otros autores (Rolao *et al.*, 2004).

El hecho de que no se detecte el parásito o anticuerpos en animales infectados parece ser un fenómeno relativamente frecuente en la leishmaniosis canina. Se ha sugerido que un único resultado negativo de PCR en un perro sospechoso clínicamente no es suficiente para descartar la infección. Diversos estudios evaluando la PCR en distintos tejidos de perros infectados han mostrado resultados variables e incluso contradictorios (Baneth y Aroch, 2008).

También hay que tener en cuenta el tipo de muestra utilizada y el estado de la misma. En este trabajo los tejidos a estudio habían sido congelados durante varios meses hasta el procesamiento de los mismos, y esto parece disminuir la fiabilidad de los resultados frente al tejido fresco (Gilbert *et al.*, 2007). Por otra parte, la eficacia de la técnica de PCR depende de varios factores como los

primers, el número de copias del parásito, el método de extracción, material biológico utilizado y el propio protocolo (Maia y Campino, 2008).

Los resultados de este estudio refuerzan la conveniencia del uso de la técnica PCR a tiempo real (qPCR) en los órganos diana más importantes como son el nódulo linfático o médula ósea, debería realizarse siempre junto a técnicas serológicas para aumentar la sensibilidad en el diagnóstico de la leishmaniosis canina.

5.1.4 ELECCIÓN PRUEBA SEROLÓGICA

5.1.4.1 CLÍNICA Y SEROLOGÍA

El diagnóstico serológico de la leishmaniosis canina se ha basado principalmente en el uso de la IFI y del ELISA, aunque sus patrones de sensibilidad y especificidad varían mucho entre los diferentes autores. Debido a la falta de un verdadero “gold estándar” (diagnóstico de referencia) para el cálculo de ambas variables en muchos casos, se ha utilizado la prevalencia como tal.

Respecto a la técnica de ELISA, las sensibilidades que se han descrito son generalmente bajas variando entre un 25-65%, aunque en algún estudio se ha descrito una sensibilidad del 100%. Sin embargo, la especificidad, es generalmente más elevada, con valores del 96% al 97,1% (Mancianti y Sozzi, 1995; Porrozi *et al.*, 2009; Fernández-Cotrino *et al.*, 2013).

En cuanto a la técnica de IFI, ocurre algo semejante a lo descrito con el ELISA, con sensibilidades muy variables entre los diferentes autores, con valores del 21,6% al 100% y especificidades altas con valores, por ejemplo, del 94,7% (Ciaramella *et al.*, 1997; Maia y Campino, 2008)

Por otra parte, cuando se comparan las técnicas entre animales con clínica y asintomáticos, los resultados también son muy variables. Porrozi *et al.* (2007), observó que ninguna de las dos técnicas era capaz de detectar animales infectados subclínicos. Sin embargo, en el estudio realizado por Mettler *et al.* (2005) la sensibilidad del ELISA en perros asintomáticos fue elevada (94,1-100%) y en sintomáticos del 100%. En este estudio, el ELISA utilizado se basaba en un antígeno soluble de promastigotes y amastigotes.

Debido a esto, para el cálculo de sensibilidad y especificidad en el presente trabajo, se utilizó como referencia la clínica expresada por los animales. La sensibilidad fue de un 88% y la especificidad de un 42,8% tanto para la IFI como para el ELISA. Esta menor especificidad encontrada en este estudio para ambas técnicas serológicas pudo ser debida a que, al establecer

el diagnóstico clínico como prueba de referencia, aquellos animales sin signos clínicos de enfermedad pero serológicamente positivos no se correspondían realmente con falsos positivos sino más bien con animales infectados de manera subclínica, que en el caso de la Leishmaniosis es muy común.

5.1.4.2 CLÍNICA, qPCR Y SEROLOGÍA.

Con el fin de obtener resultados más fiables tanto de sensibilidad como de especificidad, se decidió recalcularlas teniendo en cuenta los resultados obtenidos por qPCR por sonda TaqMan.

La sensibilidad ascendió ya que dos animales catalogados inicialmente como falsos negativos, al resultar positivos a qPCR pasaron a verdaderos positivos. Está descrito que la qPCR revela antes la presencia de DNA del parásito, incluso antes de que se produzca la seroconversión y aparezcan los signos clínicos (Oliva *et al.*, 2006; Coura-Vital *et al.*, 2011).

Por otro lado la especificidad también ascendió. De los cuatro animales que se consideraron falsos positivos, en realidad tres de ellos fueron verdaderos positivos ya que mostraron resultados de qPCR positivos.

Con esta nueva valoración y teniendo en cuenta la clínica, la sensibilidad de la qPCR y la serología ascendió a un 92,4% y la especificidad a 75%. Estos valores son semejantes a los obtenidos por Rodríguez-Cortés *et al.* (2007), que comparando varias técnicas serológicas utilizando como criterio la infección experimental, el ELISA competitivo fue la mejor técnica con una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100%. En nuestro estudio la especificidad fue más baja que la de estos autores cuando se hicieron los cálculos utilizando la qPCR TaqMan pero fue del 100% cuando se utilizó con Syber Green.

En este trabajo también se valoró la correlación entre los resultados obtenidos en qPCR con los resultados obtenidos en serología puesto que, tanto la sensibilidad como la especificidad, teniendo en cuenta todos los factores, fueron exactamente las mismas. En un estudio realizado por Manna *et al.* (2015) se demostró que existe una buena correlación entre los resultados de serología mediante IFI y la carga parasitaria ($Rho = 0,679$ y $0,705$) en todos los casos. En nuestro estudio la correlación entre la IFI y la carga parasitaria resultó muy baja, tanto en nódulo linfático como en médula ósea ($Rho = 0,01$ y $0,321$, respectivamente), sin embargo, con el ELISA la correlación fue muy buena en ambos órganos ($Rho = 0,551$ y $0,716$). Además, el ELISA también presentó datos ligeramente mejores de concordancia con el diagnóstico parasitológico.

Debido a estos resultados, el ELISA fue seleccionado como técnica de referencia para los posteriores análisis, ya que fue la mejor para el diagnóstico de la leishmaniosis en este estudio.

5.1.5 INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE LA CLÍNICA, SEROLOGÍA Y qPCR

Con el fin de tener en cuenta el sexo de los animales para los siguientes ensayos, una vez analizados todos los resultados se hizo un pequeño estudio para comprobar si el sexo de los animales influía en los resultados obtenidos. Ninguno de los parámetros estudiados (clínicos, serológicos o parasitológicos) se vió influenciado por el sexo. Respecto a los resultados obtenidos mediante serología coinciden con los publicados por Gómez-Nieto *et al.* (1992) sobre la seroprevalencia de la Leishmaniosis canina. Sin embargo, existen estudios en los que se ha observado una mayor seroprevalencia en machos, aunque sin justificación aparente (Castañeda *et al.*, 1999). Respecto a la clínica tampoco obtuvimos diferencias significativas como Perego *et al.* (2014) en un estudio retrospectivo de la clínica teniendo en cuenta únicamente presentaciones dermatológicas. Y, por último, los resultados de qPCR tampoco arrojaron diferencias entre machos y hembras en concordancia con los resultados obtenidos por Ferrer, (1992), en los que se citan resultados iguales entre ambos sexos.

5.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO EN MÚSCULO TEMPORAL

Tras el análisis de los resultados, todo parece indicar que el músculo temporal en perros infectados con *Leishmania infantum* muestra frecuentemente características patológicas de miopatía inflamatoria

En humana, las miopatías inflamatorias más comunes son las inmunomediadas que se clasifican en: polimiositis, dermatomiositis y miositis por cuerpos de inclusión (Valberg, 2008). Otras, menos comunes, incluyen la miositis focal, miositis infecciosa y miofascitis macrofágica y miopatía inflamatoria con abundantes macrófagos (Carrera *et al.*, 2006).

De forma similar, las miopatías inflamatorias en perros forman un grupo heterogéneo de desórdenes caracterizados por una infiltración inflamatoria celular en el interior del tejido muscular. Por un lado, se clasifican en infecciosas, en las cuales la causa principal de la inflamación es el daño muscular directo por los microorganismos por o sus toxinas. Entre estos agentes destacan *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Ehrlichia canis* o *Hepatozoon canis*. Y,

por otro lado, están las miopatías inmunomediadas como la polimiositis (similar a la humana), miositis de los músculos masticadores, miositis extraocular, lupus eritematoso sistémico y polimiositis por fármacos (Blot y Fuhrer, 1996).

Varios autores relacionan las lesiones producidas durante la Leishmaniosis con la polimiositis inmunomediada, siendo muy parecida a la descrita en humana. El diagnóstico se basa en el descrito por Bohan y Peter, (1975) siguiendo cuatro criterios: signos clínicos compatibles, actividad elevada de enzimas musculares, electromiografía anormal y evidencia histológica de necrosis e inflamación. Este diagnóstico se considera definitivo si los cuatro criterios se dan, probable, si son tres y posible, si solo se observan dos (Kornegay *et al.*, 1980).

En un estudio realizado por Vamvakidis *et al.*, (2000) se observó que la polimiositis en Leishmaniosis canina es de grado leve, subclínica (ya que no se encontraron desórdenes locomotores ni intolerancia al ejercicio) y crónica, que acaba en atrofia muscular. Esta atrofia muscular progresiva es más evidente en músculos masticadores (mandibular y temporal), mientras que en músculo esquelético es sutil y fácilmente atribuible a la naturaleza catabólica general de la enfermedad. En músculos masticadores, esta miositis atrófica asociada a Leishmania no llega a ir acompañada de estados de disfunción mandibular, al contrario de lo que ocurre en la forma idiopática de esta patología (Trismus), y neuropatía trigeminal (Jaw drop) formando parte del diagnóstico diferencial. Esto mismo parece ocurrir en músculo esquelético ya que no hay signos locomotores o megaesófago observados, mientras que es común en polimiositis de otra etiología (Blot y Fuhrer, 1996).

En lo que a nuestro trabajo se refiere, no pudimos valorar el diagnóstico de esta polimiositis inmunomediada según Kornegay *et al.*, (1980) ya que no se midieron los enzimas musculares ni se realizó electromiografía. Sin embargo, en concordancia a lo explicado anteriormente, en los 28 animales a estudio se encontró una gran variedad de signos clínicos. Pese a que muchos perros mostraron pérdida de peso y atrofia muscular, estos síntomas no parecieron influir en la aparición de lesión inflamatoria en el tejido. Esto coincide con la afirmación de Vamkamidis *et al.* (2000) que considera la polimiositis en perros subclínica. Además, en este estudio ninguno de los animales presentó signos clínicos muy graves, como pudiera ser una paraparesis o una atrofia muscular muy exagerada. Sin embargo, cuando se tuvo en cuenta el estado general de los animales (puntuación clínica total) se observaron diferencias significativas entre los animales que no presentaron lesión y los que sí. Es decir, los animales con estado general bueno no presentaron lesiones a nivel del músculo temporal, sin embargo, cuando los animales presentaron un estado general más deteriorado (PC mayor) el músculo temporal presentó lesión

inflamatoria. Con lo que parece ser que la aparición de lesión está influenciada por el estado general del animal más que por la gravedad de signos clínicos específicos musculares como pasa en humana, lo que sugiere que la miositis en leishmaniosis puede ser el reflejo de un cuadro multiinflamatorio general y no es la causa de la atrofia observada.

El estudio histopatológico reveló la presencia de infiltrado inflamatorio en el 75% de los 28 animales. Sin embargo, 7 animales (25%) no presentaron ninguna lesión pese a ser seropositivos y ser detectado el parásito mediante qPCR en linfonodo y/o médula ósea.

En nuestro estudio se ha demostrado que la presencia de miositis es esperable en la leishmaniosis cuando los animales presentan títulos elevados de anticuerpos y que hay diferencias significativas con respecto a la intensidad de lesión. Esto podría relacionarse con una elevada respuesta humoral y consecuente generación de anticuerpos que se discutirá más adelante.

Se detectó miositis de intensidad variable, siendo ligera o moderada en un 42,9% e intensa en un 32,1%. Esta frecuencia de aparición de lesión es menor a la encontrada por otros autores, siendo esta del 100% y de un 91,7% en los estudios realizados por Paciello *et al.* (2009) y Gomes *et al.* (2012). En ambos estudios se observan degeneración y necrosis en todos los perros, además de la inflamación, lo que sugiere una evolución crónica de la miopatía. El hecho de que las lesiones fueran menos frecuentes y de menor gravedad (ningún animal presentó degeneración ni necrosis) puede ser debido a que los animales fueron sacrificados un año tras la infección experimental, pudiendo ser tiempo insuficiente tanto para la aparición de lesión en todos los animales como para la presencia de degeneración y necrosis.

Respecto al infiltrado celular este fue mayoritariamente de linfocitos (46,4%) y de macrófagos (28,6%) y junto a un número menor de células plasmáticas. La distribución de las lesiones de la mayoría de las muestras examinadas mostraron una distribución multifocal. Resultados que concuerdan con otros autores (Vamkamidis *et al.*, 2000; Paciello *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2012).

5.2.1 PAPEL DEL PARÁSITO

Un posible origen de la polimiositis producida en esta enfermedad es la presencia del propio parásito, es decir, un origen infeccioso de las lesiones (Vamkamidis *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2012).

En el presente estudio se detectaron amastigotes por IHQ o por qPCR en 8 (38%) de los 21 perros que presentaron lesiones. En ambas técnicas la frecuencia fue la misma (23,8%), sin embargo solo dos perros fueron positivos a ambas técnicas lo que sugiere que la correlación entre ambas técnicas era escasa.

La presencia de amastigotes por IHQ siempre se detectó en lesiones de carácter intenso encontrándose diferencias significativas entre ambas variables ($P_{Ch_2} = 0,002$). Esto sugiere que la presencia del parásito agrava la miopatía inflamatoria.

Sin embargo, la qPCR los detecta cuando la inflamación es tanto intensa como ligera/moderada y no arroja diferencias significativas ($P_{Chi_2} = 0,358$).

Estos resultados son contradictorios ya que la qPCR, al ser una técnica muy sensible debería haber detectado los amastigotes en lesión intensa vistos por IHQ como Paciello *et al.* (2009) que observó correlación positiva entre la técnica de qPCR con los parásitos hallados por inmunofluorescencia. Esto puede ser debido a que, pese a que la reacción se hizo por duplicado, se cogió únicamente una sección de tejido por animal, pudiendo no coger DNA del parásito. En este punto, de cara a futuros estudios, se debería aumentar el número de biopsias por animal. Por otro lado, el límite de detección de esta qPCR fue de 2×10^2 células/mL y puede que no se detectara el parásito estando el error en la sensibilidad de la propia técnica. Sin embargo, la técnica de IHQ es muy específica pero mucho menos sensible, además de subjetiva ya que depende del observador. En este punto, puede que los amastigotes hayan pasado desapercibidos o, por la misma razón que en la qPCR, la sección de muestra obtenida no contuviera parásito.

Respecto al tropismo de los amastigotes estos siempre se encontraron en zonas de infiltración granulomatosa, concretamente en el interior de los macrófagos. En un estudio llevado a cabo por Paciello *et al.* (2009) se demostró la ausencia de DNA de *Leishmania* en el sarcoplasma de las fibras musculares aisladas, quedando confirmado que los parásitos no penetran las fibras musculares. Así pues, la presencia de amastigotes en el tejido muscular puede ser debida a la diseminación de *Leishmania* en los macrófagos desde el torrente sanguíneo a tejidos bien vascularizados como el músculo. De este modo la infección llega donde debe actuar como factor desencadenante de la respuesta inflamatoria.

Comparando con otros estudios, nuestros resultados de detección de amastigotes fueron similares a los de Gomes *et al.* (2012) que, mediante la técnica de IHQ detectó el parásito en un 20% de los animales con lesión inflamatoria. En cambio estas frecuencias difieren de otros autores, llegando a ser de un 86,7% incluso de un 100% (Vamkamidis *et al.*, 2000; Paciello *et al.*,

2009). Además estos autores describen también una clínica avanzada en estos animales (atrofia y debilidad muscular) atribuyéndola a la presencia del parásito en el tejido muscular. Contrariamente a esto, Gomes *et al.* (2012) encontró que el único perro con parararesis, asociada a electromiografía y cambios histológicos, no presentó amastigotes en músculos. Además en este trabajo, en 13 de los 21 animales que presentaron lesión inflamatoria (61%) no se detectó parásito por ninguna de las dos técnicas. Por eso no se puede afirmar que el parásito es el único responsable del desarrollo de la miopatía inflamatoria.

5.2.2 PAPEL DEL SISTEMA INMUNE

Debido a esto, se plantea la hipótesis de que la miositis se produce en consecuencia a la respuesta inmunitaria, ya que, como se ha descrito por otros autores, la miopatía canina inflamatoria inducida por *Leishmania* puede ser de origen infeccioso o inmunomediado. (Gomes *et al.*, 2012, Koutinas y Koutinas, 2014)

La progresión de la infección de *Leishmania infantum* en perros, sobre todo el empeoramiento o la regresión de los signos clínicos, es el resultado de una interacción multifactorial y compleja debida a la virulencia del parásito, el ambiente (picaduras del vector en caso de infección natural, características del cultivo de promastigotes en el caso de infección experimental) y la respuesta inmunitaria. Esta última juega un papel muy importante, ya que como se ha descrito, *Leishmania* induce una respuesta mixta Th_1 y Th_2 . El control de la replicación del parásito, progresión de la enfermedad, o la cura, están estrictamente asociados a un balance de esos dos patrones de reacción inmunitaria (Koutinas y Koutinas, 2014). La inmunidad protectora frente al parásito es mediada por linfocitos Th_1 CD4 los cuales lanzan citoquinas (IFN- γ , IL-2, y TNF- α) promoviendo la actividad anti *Leishmania* de los macrófagos mediante la vía de la producción de óxido nítrico, que es la responsable de la muerte del parásito por apoptosis (Saridomichelakis, 2009). Por otro lado, los macrófagos infectados pueden ser lisados por linfocitos T CD8 citotóxicos, incluso si el mecanismo está suprimido por la presencia de alta carga parasitaria (Ferrer, 1999).

Por el contrario, la respuesta humoral Th_2 , conlleva un aumento de células B y actividad de las células plasmáticas, lo cual no protege y se asocia con hiperglobulinemia y generación de autoanticuerpos, anticuerpos antihistona, e inmunocomplejos circulantes responsables de la inflamación en muchos órganos y tejidos como glomerulonefritis, vasculitis, uveítis, poliartritis y miositis (Koutinas y koutinas, 2014).

5.2.2.1 RESPUESTA CELULAR

Las moléculas de CD3 están presentes en todos los linfocitos T, incluyendo CD4 y CD8. Así que, detectando CD3 se valoraron ambos tipos celulares. En el presente trabajo se confirmó la presencia de CD8 de manera directa mediante la IHQ realizada, asimismo se pudo intuir la presencia de CD4 ya que, al valorar los linfocitos totales estos obtuvieron mayor % de área teñida que los CD8, o ninguno en algunos animales. Lo que lleva a pensar que los linfocitos no detectados corresponden a la subpoblación de linfocito T CD4. Así, la presencia de CD4 y CD8 confirma la respuesta mixta Th₁/Th₂, mecanismo previamente demostrado por Paciello et al. (2009).

Los linfocitos T CD3 estuvieron presentes en todos los animales que presentaron miositis inflamatoria en el tejido muscular, observándose un aumento de CD3 respecto a la intensidad de la lesión ($P < 0,001$). Asimismo se observó un aumento significativo de CD3 cuando el parásito estaba presente en la lesión ($P = 0,033$).

Además, como se ha indicado anteriormente, los tejidos en los que se detectaron amastigotes por IHQ, mostraron lesión intensa, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,002$). De la misma manera, los macrófagos aumentaron cuando la lesión se categorizó como intensa marcando además una correlación positiva de $Rho = 0,75$ y mostrando además muy buena correlación con el % de área teñida de CD3 detectado ($Rho = 0,702$).

La buena correlación entre la presencia de macrófagos, amastigotes, CD3 y la existencia de infiltrado inflamatorio, se explica por la secreción de citoquinas proinflamatorias y FNT- α por parte de los macrófagos (además de su actividad fagocítica) ya que éstos pueden estar presentes en inflamaciones crónicas (Mougneau *et al.*, 2011) como es el caso de la patogenia producida por *Leishmania*.

Siguiendo con la presencia de linfocitos, los CD8 citotóxicos, se relacionan con inmunidad protectora, como se ha explicado anteriormente, activando a los macrófagos y lisando las células infectadas con *Leishmania* (Barbiéri, 2006). En este sentido, nuestros resultados lo confirman, viéndose una correlación entre los CD8 y los macrófagos de $Rho=0,705$, así como un aumento significativo de CD8 en presencia de amastigotes ($P = 0,045$). Esto podría deberse a un reclutamiento de estos linfocitos en los órganos parasitados como se ha demostrado en perros sintomáticos que desarrollan a su vez una reducción en el número de Linfocitos T CD3 circulantes (Hosein *et al.*, 2016).

Sin embargo, los linfocitos T también se encontraron en músculos no parasitados, concretamente, en 13 de los 21 animales con lesiones (62%), no se detectó *Leishmania* ni por qPCR ni por IHQ. Estos resultados están en concordancia con otros estudios en infección natural (Gomes *et al.*, 2012), así como con un estudio realizado en hámster sirio como modelo experimental de *Leishmania*. Se demostró que los hámsters infectados desarrollan también miopatía inflamatoria con células mononucleares inflamatorias compuestas por CD3, CD4 y CD8, incluso en músculos sin inmunoreactividad a amastigotes (Paciello *et al.*, 2010).

Estos resultados sugieren que la sensibilidad de las técnicas utilizadas en estos estudios es baja o que podrían explicarse como fenómenos autoinmunes. Probablemente, ocurran ambos fenómenos.

5.2.2.2 RESPUESTA HUMORAL

Para intentar esclarecer estos aspectos se tuvieron en cuenta los resultados del estudio serológico, valorando los niveles de anticuerpos, así como la presencia de linfocitos B en las lesiones, células encargadas de producir anticuerpos, y su relación con la presencia del parásito. Cuando los animales presentaron títulos mayores de anticuerpos en sangre, se observaron diferencias significativas respecto a la intensidad de lesión. Esto quiere decir que cuando los animales tienen títulos altos de anticuerpos en sangre, se observa lesión inflamatoria en el músculo. Con lo que podría relacionarse, la respuesta humoral de generación de anticuerpos con la miopatía inflamatoria consecuencia de una respuesta inmune humoral.

Respecto a la presencia de linfocitos B en la lesión, estos se detectaron en un 66,7% (14/21) de los animales que, al igual que los linfocitos T se encontraron de forma multifocal y difusa. Además, estos se encontraron tanto en presencia como en ausencia de amastigotes, como se ha observado en los linfocitos T. Estos hallazgos podrían sugerir una naturaleza autoinmune de la enfermedad por la mayor activación de linfocitos T y B. Este fenómeno se observa en algunas enfermedades, mayormente virales o parasitarias. En la bibliografía se ha descrito cierta similitud entre *Leishmania* y lupus eritematoso sistémico ya que en ambos procesos, se generen autoanticuerpos tales como anticuerpos antinucleares (ANA) y el anti-ADN de doble cadena (anti-dsDNA) además de una hipergammaglobulinemia. (Sakkas *et al.*, 2008)

En este sentido y relacionado con la respuesta humoral, en *Leishmania* se han descrito dos reacciones de hipersensibilidad: de Tipo II (citotóxica Inmediata, mecanismo IgG IgM) y de Tipo III (complejos antígeno anticuerpo, mecanismo IgG)

Por un lado, en la de Tipo II, los anticuerpos producidos durante la respuesta inmunológica se unen a antígenos presentes en la superficie de células u otros componentes tisulares. Las IgG e IgM, cuando se unen a estos antígenos forman complejos antígeno-anticuerpo que activan la vía clásica del complemento y generan mediadores de inflamación en ese sitio. Los anticuerpos IgM e IgG van dirigidos contra antígenos celulares o tisulares (en nuestro caso sería la propia *Leishmania* en el tejido muscular). En este punto, las IgM, mediante activación del complemento, generarían hemólisis intravascular y las IgG producirían destrucción por células fagocíticas.

En este estudio se detectó la presencia de IgG en el 62% de animales e IgM en el 43%. y aparecían tanto en presencia como en ausencia del parásito. Esto demuestra que una respuesta humoral importante en músculo puede contribuir a la patogenia de la miostis en la leishmaniosis canina. Parte de esta hipótesis se explicaría por la buena correlación existente entre las IgG, IgM y los macrófagos encontrado en las lesiones ($Rho = 0,557$ y $0,64$, respectivamente)

En este punto cabría plantearse si la presencia de la IgM es debida a una activación de la infección subclínica, con lo que perdería fuerza la teoría del carácter crónico de la patogenia producida por esta enfermedad. Para ello se debería hacer un estudio más en profundidad como por ejemplo detectando proteínas de fase aguda en los diferentes tejidos mediante técnicas moleculares o inmunohistoquímicas.

Por otro lado, referido a la patogenia producida por *Leishmania*, se describe la reacción de hipersensibilidad tipo III. En la circulación se forman los complejos inmunológicos (inmunocomplejos) y se depositan en los tejidos donde pueden activar la vía clásica del complemento.

En el depósito de estos tejidos se liberan mediadores de la inflamación aguda que activan el complemento y se activan los fagocitos. Cuando los macrófagos tisulares residentes encuentran complejos inmunitarios, se estimula en ellos la secreción de $TNF-\alpha$, IL-1, PAF, óxido nítrico y radicales de oxígeno. Al final, los complejos se pueden eliminar, pero en este proceso se liberan gran cantidad de proteasas y radicales de oxígeno responsables del daño tisular.

Otra explicación a la ausencia de parásitos en áreas de infiltrado inflamatorio es, de nuevo, la naturaleza autoinmune de la enfermedad, mediante el mecanismo del mimetismo antigénico. Este mecanismo consiste en que la secuencia proteica de ciertos virus, bacterias o parásitos son homólogas a las secuencias autoantigénicas. Este mimetismo no se ha estudiado hasta la fecha en tejido muscular en leishmaniosis canina, sin embargo, se ha encontrado en músculo cardíaco

entre la proteína B13 de *Tripanosoma cruzi* y antígenos cardíacos, generando una reacción cruzada (Cunha-Neto *et al.*, 1996).

Habitualmente, el depósito de inmunocomplejos se realiza en ciertas localizaciones como los glomérulos o en vasos. En nuestro caso, solo se observaron las inmunoglobulinas asociadas a zonas de linfocitos B. mostrando buena correlación ($Rho = 0,47$ entre linfocitos B e IgG y $Rho = 0,52$ entre Linfocitos B e IgM).

Nuestros resultados sugieren que las lesiones musculares en la infección por *Leishmania* se deben a un mecanismo multifactorial, incluyendo respuesta inmune celular y humoral así como daño directo por el parásito. Sin embargo, la naturaleza catabólica de la enfermedad probablemente interactúa con otros factores, pero no puede ser la única responsable de la miositis inflamatoria. Además, la presencia de IgG e IgM en el lugar de inflamación sugiere una reacción de hipersensibilidad tipo II, y la presencia de IgM que puede existir una reactivación de la enfermedad subclínica permanentemente.

5.3 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO EN TESTÍCULO Y EPIDÍDIMO

En general la orquitis es rara en todas las especies domésticas mientras que la epididimitis es frecuente. En ocasiones, ambos órganos están afectados conjuntamente, sin embargo, la mayoría de los casos diagnosticados clínicamente como orquitis se corresponden en realidad con epididimitis (Jubb Kennedy, 2015).

En la especie canina, se han descrito varios procesos que pueden producir lesión en ambos órganos. Los principales son de carácter infeccioso, entre los que se incluyen bacterias (brucelosis, *E. coli*), virus (moquillo), hongos (blastomicosis, coccidioidomicosis) y parásitos (leishmaniosis). Menos frecuentemente, se han descrito orquitis inmunomediadas y traumáticas.

Respecto a las orquitis inmunomediadas, estas se desarrollan tras la exposición de los antígenos de los espermatozoides al sistema inmunitario, hecho que, normalmente no ocurre debido a la protección que aporta la barrera hematotesticular. Las enfermedades traumáticas e infecciosas del epidídimo o las testiculares pueden dañar esta barrera y producir exposición de estos antígenos a la circulación general, y al sistema inmunitario. Como consecuencia, se desarrolla una invasión de linfocitos y células plasmáticas a los tejidos intersticiales del testículo y epidídimo. Este infiltrado causa deterioro del epitelio seminífero.

Los resultados observados en este estudio demuestran que la orquitis y epididimitis es frecuente en perros infectados de forma experimental por *Leishmania infantum*, hecho que corrobora lo descrito en los pocos estudios que hay hasta el momento, todos ellos en casos naturales (Diniz *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2016). En nuestro estudio, las lesiones en el epidídimo se detectaron en el 94,1% de los animales mientras que en el testículo en un 55,6%. Además, a semejanza de estos autores la intensidad es mayor también en epidídimo.

Este estudio, al igual que lo descrito por Diniz *et al.* (2005) muestra que la intensidad de lesiones en el reproductivo se relaciona con el estado clínico de los animales, a pesar de que los animales no muestran sintomatología sugerente de alteración reproductiva, o que quizá pase desapercibida. A diferencia de Diniz *et al.* (2005), en nuestro estudio solo se detectaron correlaciones positivas entre la intensidad de la orquitis y el estado clínico, pero no con la epididimitis. El hecho de que la inflamación en epidídimo sea más frecuente podría explicar este hallazgo.

Uno de los objetivos de este estudio era intentar relacionar los niveles de anticuerpos con las características lesionales y ver si aquellos podrían predecir un posible exceso de depósitos de inmunocomplejos que justificasen la lesión reproductiva o la lesión glomerular, otro aspecto de este estudio, todo ello como representación de una reacción de hipersensibilidad de tipo III. Sin embargo, nuestros resultados han mostrado que las titulaciones de anticuerpos detectadas por ELISA no tuvieron influencia en las lesiones observadas tanto en testículo como en epidídimo, lo cual sugiere que la patogenia debido al depósito de inmunocomplejos no puede explicar por sí solo el cuadro clínico.

Por otra parte, este estudio representa la primera caracterización inmunohistoquímica de la celularidad observada en órganos reproductivos de perros infectados por *Leishmania* con resultados que pueden contribuir a esclarecer la patogenia de la enfermedad. A nivel reproductivo, se han sugerido factores intrínsecos al parásito o debido a efectos inmunológicos. Según Euzeby, (1994) el perro tiene poca capacidad de desarrollar reacciones inmunes contra el parásito, por ello, *Leishmania* es básicamente viscerotrópica, causando reacciones inflamatorias que se caracterizan por la formación de manguitos perivasculares compuestos por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, que ejercen una fuerte compresión sobre los capilares hasta causar isquemia que puede resultar en lesiones en los tejidos. Por el contrario, Louzir y Dellagi (1999) indican que hay evidencia de trastornos inmunológicos y las lesiones observadas podrían explicarse por la secreción de ciertas citoquinas y monoquinas o por trastornos autoinmunes.

Nuestros hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos siguen el mismo patrón observado en el tejido muscular y sugieren que hay factores inmunológicos involucrados en las mismas ya que, en ausencia del parásito, existe abundante presencia de linfocitos, células que no son diana del parásito, así como importantes acúmulos de inmunoglobulinas.

5.3.1. PAPEL DEL PARÁSITO

Para valorar el papel del parásito en las lesiones se intentó relacionar su presencia con las lesiones y sus características. En general, la presencia del parásito en las lesiones detectadas en este estudio podría considerarse más bien escasa y, cuando se detecta, lo es especialmente en el epidídimo, hecho que confirma lo descrito por otros autores (Diniz *et al.*, 2005; Cardoso, *et al.*, 2016). Así, mediante la técnica de qPCR se detectó DNA parasitario en el 37,5% de las lesiones de epididimitis mientras que mediante IHQ el parásito fue observado en el 18,8%. Sin embargo, en testículo, solo un perro presentaba DNA parasitario. Estos resultados sugieren, descartando una escasa sensibilidad de las técnicas, que las lesiones pueden ser debidas, en parte, a alteraciones inmunológicas.

Otro hallazgo que puede sugerir este hecho son los datos obtenidos en el epidídimo. El estudio estadístico no mostró diferencias significativas entre la presencia del parásito y la intensidad lesional, detectándose tanto en lesiones de intensidad leve como intensa, sugiriendo que la intensidad lesional podría deberse a otros factores que solo a la presencia parasitaria.

Algunos autores, sin embargo, consideran que las lesiones observadas en testículo, caracterizadas por inflamación, degeneración y atrofia de los túbulos seminíferos, son efecto directo del parásito (Amara *et al.*, 2009; Gomes de Oliveira *et al.*, 2016).

Lo que parece claro es que la presencia del parásito modula el tipo de lesión. Debido al tropismo del parásito por los macrófagos, este fue principalmente en el epidídimo en el cual las lesiones fueron predominantemente granulomatosas, mientras que en el testículo, en el que fueron linfoplasmocitarias, fue detectado en un solo caso. Estos hallazgos han sido previamente observados por otros autores (Benites *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2016). Además, dentro del 76,4% de las lesiones granulomatosas, muchas se acompañaron de un número elevado de neutrófilos, lo que sugiere una reactivación de la respuesta inmunitaria.

Por otra parte, la presencia del parásito en las lesiones puede depender de la sensibilidad de las técnicas utilizadas. En nuestro caso, la qPCR mostró mayor sensibilidad a la hora de detectar el parásito en los tejidos como puede observarse con la mayor positividad demostrada en testículo

y epidídimo. Sin embargo, existe la posibilidad de que la presencia de DNA de parásito esté relacionada a algún vaso sanguíneo con DNA de *Leishmania* en su interior, como propuso Brinsko (2004) estudiando la leishmaniosis en el glándula. Sin embargo, la IHQ, que es más específica presenta algunos inconvenientes como la subjetividad del observador o la elección del corte, que debido a la presencia multifocal del parásito, puede ser negativo (Xavier, 2006). Nuestros resultados indican que la alta carga parasitaria detectada por qPCR y el infiltrado crónico no garantiza que los amastigotes sean detectados por IHQ.

Los resultados de nuestro estudio han demostrado que la probabilidad de encontrar el parásito en el epidídimo es mayor que en el testículo. Esto puede ser debido a diferentes causas. Por una parte, la llegada del parásito a este tejido puede haber sido por posibles procesos inflamatorios preexistentes donde han podido llegar macrófagos conteniendo *Leishmania* en su interior como sugiere (Diniz *et al.*, 2005). Otro posible origen, como ocurre con *Brucella canis* (Corrente *et al.*, 2010), es que el tropismo del parásito por el epidídimo sea mayor que por el testículo, siendo capaz de vencer la barrera inmunitaria más fácilmente que en el testículo. Esto también ha sido descrito por otros autores (Gomes de Oliveira *et al.*, 2016), los cuales estudiaron varios tejidos del sistema reproductor masculino, siendo los más parasitados el epidídimo y la próstata. Este posible mayor tropismo por el epidídimo, explicaría la fuerte reacción inflamatoria que se ha detectado, tanto a nivel de intensidad y gravedad de las lesiones, como por la cantidad de células inflamatorias localizadas de todo tipo por IHQ.

La poca presencia de amastigotes en testículo detectada en el presente trabajo sugiere un origen inmunomediado de las lesiones ya que, como se ha descrito anteriormente, las enfermedades traumáticas e infecciosas tanto del epidídimo como las testiculares pueden dañar la barrera hematotesticular produciendo exposición de estos antígenos a la circulación general, y al sistema inmunitario. Y, consecuentemente desarrollarse una invasión de linfocitos y células plasmáticas a los tejidos intersticiales del testículo causando a su vez el deterioro del epitelio seminífero.

Por otra parte, la mayor presencia del parásito en epidídimo sugiere la posibilidad de eliminación del parásito por el semen facilitando la transmisión venérea de la leishmaniosis, hecho ya sugerido por otros autores (Naucke y Lorents, 2012).

5.3.2 PAPEL DEL SISTEMA INMUNE

5.3.2.1 RESPUESTA CELULAR

Uno de los propósitos de esta tesis era contribuir al conocimiento de la patogenia de la infección por *Leishmania* en el aparato reproductor, y para ello se estudió el componente celular de las lesiones mediante IHQ y se comparó con la presencia del parásito. Este estudio supone además el primer estudio inmunohistoquímico en el reproductor de perros infectados por este parásito. Los resultados sugieren respuestas diferenciadas en ambientes diferentes (testículo y epidídimo) frente a la infección por *Leishmania infantum*.

Respecto al epidídimo, en este órgano se detectaron linfocitos T en un 100% y linfocitos B en un 93,8% de todos los infiltrados inflamatorios detectados previamente por HE, demostrando así una fuerte respuesta inmune local. Respecto a los linfocitos T en testículo se detectaron en un 90% de las lesiones y linfocitos B en un 40%. Sin embargo, no se detectó aumento significativo de linfocitos T y B en presencia de amastigotes en ninguno de los tejidos, lo que sugiere, que la presencia de parásito puede no ser el único factor desencadenante de este tipo de respuesta inflamatoria local y que esta esté reaccionando frente a inmunocomplejos o autoanticuerpos presentes en el tejido.

Este resultado difiere, sin embargo, de lo descrito por Diniz *et al.* (2005). Este autor encontró una buena relación entre la presencia de linfocitos y la de *Leishmania*, tanto en testículo como en epidídimo, afirmando que el parásito es el desencadenante de la respuesta inflamatoria.

En este punto hay que tener en cuenta la habilidad del testículo en proteger las células germinales auto-antigénicas del sistema inmune considerándose un lugar inmunológicamente privilegiado. La inmunotolerancia en el testículo es ampliamente conocida en base al hecho de que las células de Sertoli separan mecánicamente todas las células germinales (auto-antígenos) por medio de la barrera hematotesticular (De Cesaris *et al.*, 1992). Además, Según Uksila (1990), en el testículo no suelen activarse los linfocitos y, si se establece el contacto primario entre las células inmunológicas y el antígeno, no se genera respuesta inmune. Esto explicaría, en parte, la menor reacción inflamatoria encontrada en este tejido en comparación con el epidídimo así como el músculo temporal, donde las lesiones se encontraron en mayor número y gravedad.

Además, tanto en testículo como en epidídimo, se encontró buena correlación entre la inflamación y los linfocitos T CD3, así como con los Linfocitos T CD8. Como se ha explicado anteriormente en el estudio de muscular, de manera indirecta se puede intuir la presencia de

linfocitos T CD4. Esto sugiere que, tanto los linfocitos T CD4 como los CD8, una vez en el testículo podrían iniciar una respuesta inflamatoria que, a su vez, desencadenase un aumento de la expresión de citoquinas para la presentación de antígeno, formando parte de la patogénesis iniciando así el daño tisular.

Los CD8 se relacionan con inmunidad protectora, como se ha explicado anteriormente, activando a los macrófagos y lisando las células infectadas con *Leishmania* (Barbiéri 2006). En este sentido, en epidídimo, nuestros resultados no lo confirman, viéndose una mala correlación entre ambos. Además no se encuentra un aumento significativo de CD8 en presencia de amastigotes. Todo esto sugiere que estos hayan estado presentes, hayan estimulado la respuesta inmune correspondiente y que ya no estén o bien no los hemos detectado.

En cambio en testículo si que se ha observado buena relación entre los macrófagos y los linfocitos T CD8 ($Rho\ 0,712\ P = 0,001$) con lo que reforzaría la relación de los CD8 con la inmunidad protectora en testículo, junto con el aumento significativo de los mimos que se vio en el único animal donde se detectó DNA del parásito. ($P = 0,001$).

5.3.2.2 RESPUESTA HUMORAL

En todos los animales a estudio se observó una gran respuesta humoral detectada por ELISA, sin embargo, en el presente estudio no se observó una relación significativa entre los niveles de anticuerpos detectados en sangre y la gravedad de las lesiones encontradas tanto en testículo como en epidídimo.

Como se ha nombrado anteriormente, en testículo, se han detectado linfocitos B en un 40% de los animales que presentaron infiltrado celular. La presencia de estos linfocitos no se relaciona estadísticamente ni con la presencia de parásito en los mimos ni con la intensidad de lesión. Es decir, la presencia de Linfocitos B no aumenta con la gravedad de las lesiones. Así pues, como se ha sugerido en el capítulo de muscular, se podría relacionar con una enfermedad autoinmune en la que aumenta la activación de células T y B. Todo ello asociado a hipergammaglobulinemia y generación de anticuerpos, llegando a ser incluso autoanticuerpos.

En este punto cabe recordar que la mayoría de las globulinas presentes en exceso en la fase de infección del parásito, se corresponde esencialmente con inmunoglobulinas G (IgG), pero también se detectan otras como IgM e IgA. Una gran parte de ellas no son anticuerpos parasitoespecíficos sino anticuerpos inespecíficos (consecuencia de la activación policlonal de los linfocitos B por mitógenos parasitarios) algunas citoquinas complejos antígeno-anticuerpo, auto-

anticuerpos e inmunoglobulinas atípicas (Vitu *et al.*, 1973; Cabassu *et al.*, 1988; Slappendel, 1988; Barral-Netto *et al.*, 1991). Como ya se ha comentado en el capítulo de inmunopatología, estos anticuerpos no son protectores, por lo que no confieren resistencia frente a la enfermedad.

En el presente trabajo, se observaron, sobre todo en epidídimo, tanto IgG como IgM. Ambas inmunoglobulinas están relacionadas con la formación de inmunocomplejos y con la generación de reacciones de hipersensibilidad tipo II o III como se ha descrito en otros tejidos en esta enfermedad.

En testículo se detectó un número variable de células plasmáticas tipo IgG (en un 40% de animales) e IgM (en un 50% de animales) en el infiltrado celular, tanto en presencia como en ausencia del parásito. Además se observó un aumento significativo ($P_{KW} < 0,001$) de ambas inmunoglobulinas respecto a la intensidad de lesión. Esto sugiere que la respuesta humoral es causante del daño tisular testículo.

Parte de esta hipótesis se explicaría por la buena correlación existente entre las IgG, IgM y los macrófagos encontrados en las lesiones ($Rho = 0,506$ $P < 0,032$ y $Rho = 0,719$ $P = 0,001$, respectivamente). Resultados en concordancia con el restudio realizado por Benites *et al.* (2011) en genital masculino, donde asocia la presencia de infiltrado intersticial inflamatorio compuesto por macrófagos y células plasmáticas, a la infección por *Leishmania infantum*.

La ausencia de parásitos en áreas de infiltrado inflamatorio y la presencia de estas inmunoglobulinas, sugiere de nuevo la naturaleza autoinmune de la enfermedad, mediante el mecanismo del mimetismo antigénico, mecanismo de evasión donde el parásito se recubre de moléculas parecidas a otras del hospedador, contra las cuales este no responde.

En este punto cabría plantearse si la presencia de la IgM es debida a una activación de la infección subclínica, con lo que perdería fuerza la teoría del carácter crónico de la patogenia producida por esta enfermedad. Para ello se debería hacer un estudio más en profundidad como se ha propuesto en el estudio de musculo temporal, detectando de presencia en la lesion de proteína de fase aguda.

Al igual que en testículo, en epidídimo se detectaron linfocitos B en la mayoría de las lesiones, concretamente en un 93,8% de los animales que presentaron lesión. Además, tampoco se vió un aumento significativo ni con la presencia de amastigotes ni con la intensidad de la lesión, lo que sugiere, nuevamente, la naturaleza autoinmune de la enfermedad.

La cantidad tanto de IgG como de IgM fue muy alta en este tejido, encontrándose, en ambos casos, en un 81,3% de las lesiones. También se detectaron macrófagos en la mayoría de las mismas (87,5%) que, junto a la presencia de infiltrado celular sugiere, como se ha indicado en testicular, una patogenia producida por *Leishmania infantum*. Sin embargo, no se ha observado relación entre las inmunoglobulinas, los macrófagos y la intensidad de lesión, denotando que la patogenia que se produce en éste tejido en lo que a respuesta humoral se refiere, es muy intensa a la vez que inespecífica, ya que no lo hemos podido relacionar con ningún factor a estudio.

5.4 ESTUDIO DE NGAL COMO BIOMARCADOR DE DAÑO RENAL CRÓNICO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR LEISHMANIA INFANTUM

Existen varios marcadores que se han relacionado con la enfermedad renal producida por leishmaniosis. En suero, se han valorado proteínas y enzimas como la creatinina y dimetil-arginina simétrica (SDMA) y, en orina, el ratio proteína total/creatinina sérica (UPC), inmunoglobulinas(IgG), proteína C-reactiva (CRP), ferritina, gamma glutamil transpeptidasa (GGT), N-acetil-D-glucosaminidasa (NAG) y proteína de unión al retinol RBP. (Martínez-Subiela *et al.*, 2013; García-Martínez *et al.*, 2015; Pardo-Marín *et al.*, 2016). Pero a día de hoy, no se han encontrado estudios sobre la eficacia de la proteína NGAL en la detección de daño renal en perros infectados con *Leishmania infantum*. Además en la mayoría de estos estudios, no se ha detallado el daño renal mediante histología para valorar de forma eficaz y fiable el comportamiento de estos biomarcadores.

5.4.1 PROTEINURIA

En el presente trabajo, nuestros resultados confirman que el ratio UNC aumenta de forma significativa cuando los animales muestran una proteinuria de carácter leve (categorizados como Grupo 2, es decir, proteinúricos “borderline”), lo que sugiere que el UNC es un buen marcador de daño glomerular leve.

Además, también se encontró un incremento significativo del ratio UNC entre los animales con proteinuria leve “borderline” y animales proteinúricos sin azotemia (Grupos 2 y 3, respectivamente). A modo recordatorio los animales azotémicos son los que expresan valores de creatinina en suero mayores a 1,4mg/dL. Esto sugiere que el aumento del ratio de UNC en orina,

puede ser detectado antes que el aumento de creatinina en suero y, consecuentemente, puede considerarse un marcador más precoz de daño renal que la creatinina.

La aparición de proteínas de bajo peso molecular, como NGAL, en orina, puede ser debida a la saturación de la capacidad de reabsorción de las células tubulares (Cianciolo *et al.*, 2016). De manera generalizada, se acepta que un aumento en orina de proteínas de bajo peso molecular o de enzimas tubulares, indican daño tubular, de lo contrario, un aumento de las proteínas de medio y alto peso molecular en orina indican daño renal a nivel glomerular. Sin embargo, un aumento en la filtración de proteínas de medio y alto peso molecular puede que interfiera en la reabsorción de proteínas de bajo peso molecular por parte de los túbulos (Nabity *et al.*, 2012).

Por otro lado, en estados leves de daño renal, las proteínas de alto y medio peso molecular compiten con las de bajo peso molecular en la reabsorción, resultando en la aparición de proteínas de alto, medio y bajo peso molecular en la orina (Vinge *et al.*, 2010) así pues, se puede pensar que la reabsorción de proteínas resulta de eventos separados. En fases tempranas (en nuestro caso animales proteinúricos borderline), un aumento de proteínas de alto y medio peso molecular en el lumen tubular compiten con las proteínas bajo peso molecular normalmente filtradas libremente, reduciendo así la reabsorción de las proteínas y siendo excretadas en la orina (esto explicaría daño glomerular sin daño tubular). Y, por otro lado, la reabsorción tubular de proteínas puede estar alterada a medida que la enfermedad progresa debido a la exacerbación de la inflamación o del ambiente citoquínico humoral proinflamatorio (por el depósito de inmunocomplejos) sobrecargando el lumen de los túbulos proximales directa o indirectamente.

Asimismo, en un estudio realizado por Hsu *et al.* (2014), en perros con insuficiencia renal aguda y crónica producidas por diferentes causas, observaron que NGAL es un buen marcador tanto en suero como en orina en perros azotémicos, especialmente en perros con enfermedad crónica. Observaron que los valores de NGAL fueron significativamente mayores en azotémicos que en perros sanos. Sin embargo, se observó una baja probabilidad de que el aumento de la concentración de NGAL urinario sea capaz de explicar estados de daño renal muy avanzados. Con lo que no recomienda el uso de este biomarcador para el establecimiento de un diagnóstico y pronóstico en pacientes con enfermedad renal avanzada.

Respecto a nuestro estudio, el hecho de que no se detectaron animales azotémicos con valores de creatinina por encima de 1,4mg/dL, no nos permitió monitorizar el comportamiento de NGAL cuando el daño renal se encuentra muy avanzado. Lo que correspondería a animales del Grupo 4, es decir, proteinúricos y azotémicos.

Algunos autores, para explicar el rol del NGAL en el daño renal han propuesto la “teoría del bosque en llamas” (Mori y Nakao, 2007). En esta analogía, las nefronas representarían a los árboles en el bosque y el NGAL sería el fuego. Tras el daño, las nefronas restantes reestablecen la función renal, el cual se valora por la tasa de filtrado glomerular (GFR) y es evaluada normalmente por la concentración de creatinina sérica. En este modelo, el NGAL indicaría las lesiones activas durante el daño. Aunque el daño aumenta en paralelo con disminución de la función, en teoría, NGAL y creatinina sérica representan diferentes funcionalidades. Dicho de otro modo, según esta analogía, tiene que haber daño activo para que el NGAL aumente puesto que sin árboles no puede haber fuego. Con ello, este biomarcador puede ser muy útil en las reagudizaciones que ocurre en las IRC o como marcador de estabilidad.

5.4.2 HISTOLOGÍA

Durante la infección de *Leishmania infantum* los perros desarrollan lesiones a nivel glomerular que, con el paso del tiempo, degeneran a lesiones tubulares hasta producir el daño renal irreversible. Respecto a las lesiones glomerulares, pueden ser clasificadas a su vez en: glomerulonefritis membranosa, membranoproliferativa, mesangial o glomerulonefritis focal segmental. La frecuencia de aparición entre las mismas suelen mostrar diferencias sustanciales entre los diferentes estudios en *Leishmania infantum* (Zatelli *et al.*, 2003). Concretamente, según Jubb Kenedy, (2015), el parásito produce glomerulonefritis de tipo mesangioproliferativa con inmunocomplejos a nivel del mesangio, membranoproliferativa con inmunocomplejos en el subendotelio y mesangio, y glomeruloesclerosis sin inmunocomplejos definitivos. Tratándose además, de un proceso muy pausado donde tanto la progresión como la resolución son lentas.

En nuestro estudio encontramos dos tipos de glomerulonefritis, un 48% de los animales de tipo mesangioproliferativa y un 36 % de tipo membranoproliferativa (un 16% no presentó lesiones de ningún tipo). Además, no se encontraron signos evidentes de daño tubular. Esto puede ser explicado por la infección experimental, donde los animales fueron sacrificados un año tras la infección y, probablemente, no sea tiempo suficiente como para obtener daño renal grave. Respecto a la inflamación intersticial se observó en un 50% de los animales aproximadamente que, debido a la baja intensidad de la misma no influyó en el comportamiento del UPC ni del UNC.

Cuando la gravedad de las lesiones renales se valoraron mediante histología el análisis anatomopatológico mostró, únicamente lesiones glomerulares, con lo que este estudio es el idóneo para valorar si UNC es útil para marcar lesiones de tipo glomerular.

Así pues, los resultados de presente trabajo demostraron que, tanto el UPC como el UNC, aumentan de manera progresiva junto al daño renal, concretamente junto a la glomerulonefritis detectada. La pérdida de la selección normal de proteínas por orina puede ser identificada por la presencia de proteinuria. Según la bibliografía, el ratio UPC permite la evaluación de enfermedad glomerular primaria, o lo que es lo mismo la glomerulonefritis (Dibartola, 2000). Sin embargo, en nuestro estudio, pese al aumento progresivo de UPC, se encontró una gran variabilidad de los datos en cada grupo en comparación con los valores que mostró UNC, revelando en todos los grupos poca dispersión de los datos. Es decir, UNC parece diferenciar de forma más fiable los diferentes estados de daño renal que el UPC.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Nabity *et al.*, (2012) donde se correlacionó el NGAL con el daño glomerular. Con ello podemos confirmar que NGAL es un biomarcador de daño glomerular ya que ningún animal mostró daño tubular evidente.

Por otro lado, según Zatelli *et al.* (2003), las lesiones glomerulares que caracterizan el daño renal en perros con *Leishmania infantum*, determinan la aparición de proteinuria, independientemente del tipo de lesión glomerular apreciada por histología Sin embargo nuestros resultados están en desacuerdo con esta afirmación. En el presente estudio, el UPC no fue capaz de detectar la gravedad de la glomerulonefritis cuando es de tipo membranoproliferativa. Se observó un aumento de UPC en animales con menos del 50% de los glomérulos afectados (Grupo Grado 2) y una disminución en animales con más del 50% de los glomérulos afectados (Grupo Grado 3). Por el contrario, en estos animales, el ratio UNC aumentó en paralelo al daño renal.

Con estos resultados podemos decir que NGAL no solo marca de manera eficaz las lesiones glomerulares si no que es mejor indicador que el UPC ya que este, cuando la glomerulonefritis es membranoproliferativa, no se corresponde con la gravedad del daño.

Además, como se ha descrito anteriormente, el ratio UNC diferencia de manera significativa los animales sin proteinuria de los animales con proteinuria leve. Todo esto plantea la posibilidad de sustituir el UPC como marcador en orina de daño renal por el UNC, por lo menos, tanto para diagnosticar como para monitorizar el daño renal producido por *Leishmania infantum*. Es decir, se ha demostrado que no solo detecta el daño renal cuando es de carácter leve, si no que aumenta de manera significativa con el aumento de daño renal valorado tanto a nivel de proteína en orina (según IRIS 2015) como a nivel histológico.

5.4.3 RELACIÓN OTROS TEJIDOS

Debido a que la leishmaniosis canina es una enfermedad crónica de carácter inflamatorio que afecta a la mayoría de los órganos y tejidos del animal en el presente trabajo se relacionó la patogenia producida en el tejido muscular y reproductor masculino con el daño glomerular detectado por histología. Los resultados confirmaron una buena relación entre el grado de intensidad de la lesión en epidídimo con el grado de glomerulonefritis. Sin embargo, no se detectó esta relación ni en muscular ni en testículo. Este hallazgo confirmaría, en parte, que los procesos patogénicos son independientes pese a ser producidos por el mismo agente. En el caso del epidídimo, más que una relación directa entre epidídimo y tejido renal, podría atribuirse a la intensidad de la lesión detectada en epidídimo, ya que en este tejido la reacción inflamatoria, manifiesta por la gran cantidad de células detectadas por IHQ, fue mayor que en el resto de tejido estudiado.

Por último, en los últimos años, se ha relacionado la proteína NGAL con enfermedades autoinmunes incluyendo desordenes inmunitarios e inflamación mediada por inmunocomplejos. También se ha detectado relación con desórdenes músculo esqueléticos, metabólicos e incluso, con procesos inflamatorios en el sistema nervioso central, en tejidos linfoides e hígado, entre otros (Abella *et al.*, 2015). Así que, debido a que la leishmaniosis canina produce la mayoría de las alteraciones citadas, es de vital importancia descartar que el NGAL detectado en orina debido a otro desorden inflamatorio ajeno al daño renal. Los resultados obtenidos sugieren que el origen del aumento de NGAL detectado en orina es de origen renal principalmente ya que, en nuestro estudio, no se detectó relación entre la proteína a estudio y la lesión muscular así como entre el NGAL y la lesión testicular y epididimaria.

6. CONCLUSIONES

La realización de los diferentes estudios del presente trabajo ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. La infección experimental realizada en este trabajo se reveló efectiva en la reproducción de la enfermedad y/o en la seroconversión y/o detección del parásito en órganos diana. Los signos clínicos se observaron en el 62% de los animales, los anticuerpos se detectaron en el 90% y la presencia del parásito en el 100%.
2. Este estudio ha evidenciado que animales de la misma especie infectados por *L. infantum* manifiestan la enfermedad clínica de forma diferente, permaneciendo muchos de ellos subclínicos. Los que manifiestan síntomas clínicos lo hacen principalmente con lesiones cutáneas, linfadenopatías y adelgazamiento.
3. La comparación de técnicas serológicas demostró que el ELISA, en comparación con la IFI, fue más adecuada para la confirmación de la infección debido a una mejor correlación con la técnica molecular de qPCR. Esto puede sugerir que la IFI como técnica de referencia podría ser sustituida por el ELISA.
4. El sexo de los animales no influyó en la aparición de signos clínicos, ni en la seroconversión, ni tampoco en la carga parasitaria en los órganos diana (linfonodos y médula ósea).
5. El estudio histopatológico reveló que la presencia de lesiones en músculo y órganos reproductivos de perros infectados por *L. infantum* es frecuente, incluso en ausencia de clínica relacionada con estos sistemas. Esto sugiere que las lesiones en estos órganos son el reflejo de un cuadro multiinflamatorio.
6. El estudio histopatológico demostró que las lesiones pueden ser de tipo linfoplasmocitario o granulomatoso. Además, corroboró que la observación del parásito es difícil con técnicas rutinarias, y que cuando aparece lo es en lesiones granulomatosas.
7. El estudio inmunohistoquímico reveló que las lesiones están compuestas por abundantes linfocitos T, especialmente CD8, linfocitos B y macrófagos, predominando estos últimos en las lesiones severas, y que hay una elevada producción de inmunoglobulinas de tipo G y M.
8. La presencia de IgG de IgM en el lugar de inflamación sugiere una reacción de hipersensibilidad tipo II, y la presencia de IgM que puede existir una reactivación de la enfermedad subclínica permanentemente en todos los tejidos a estudio. Esto estaría en concordancia con los focos de inflamación piogranulomatosa observados en algunas lesiones del epidídimo, ya que los neutrófilos son considerados como células de defensa iniciales. En estos casos la lesión puede denominarse como crónica activa.

9. Mediante serología se observó que los niveles elevados de anticuerpos se relacionaban generalmente con lesiones predominantemente linfoplasmocitarias, sugiriendo que los títulos de anticuerpos pueden orientar al tipo lesional y posible patogenia.
10. La detección de amastigotes fue generalmente baja, incluso en lesiones severas, lo que sugiere que la sensibilidad de las técnicas utilizadas en estos estudios es baja o bien que la aparición de estas células en ausencia de parásito es debida a fenómenos autoinmunes.
11. Los amastigotes fueron detectados principalmente en las lesiones de carácter intenso y de tipo granulomatoso, tanto en muscular como en reproductivo. Esto sugiere que las lesiones más leves, que se corresponden principalmente con linfocitos, podrían deberse a una disfunción inmunitaria.
12. En el reproductivo se ha observado una gran diferencia en cuanto a las características lesionales así como a la presencia del parásito. En el epidídimo las lesiones fueron de mayor intensidad y predominantemente granulomatosas mientras que en el testículo fueron más leves y predominantemente linfoplasmocitarias. Además, el parásito fue detectado mucho más frecuentemente en el epidídimo. Esto sugiere que la llegada de *L. infantum* a epidídimo es mucho más fácil que al testículo y que las lesiones en este estarían más relacionadas con alteraciones inmunitarias.
13. Las lesiones observadas en riñón tras la infección experimental con *Leishmania infantum* se utilizaron para valorar la utilidad de la proteína NGAL, y se correspondieron principalmente con glomerulonefritis de tipo membranoproliferativo o mesangioproliferativo, acompañadas de nefritis intersticial crónica de carácter leve en alguno de los animales. No se observaron lesiones tubulares ni otras lesiones de tipo más crónico como glomeruloesclerosis o fibrosis.
14. El ratio UNC se puede considerar un buen marcador de daño renal en animales con *Leishmania infantum* ya que aumenta de manera significativa cuando los animales presentan una proteinuria leve (bordeline). Por ello, puede ser muy útil en las reagudizaciones que ocurren en la Insuficiencia renal crónica o como marcador de estabilidad en los pacientes.
15. La proteína NGAL es un buen marcador de daño glomerular en la infección por *Leishmania* puesto que el ratio UNC aumenta de manera progresiva con la glomerulonefritis, tanto si es de tipo membranoproliferativa como mesangioproliferativa. Un posible origen tubular fue descartado por las lesiones renales y un posible origen inflamatorio por la ausencia de relación con la inflamación observada en músculo y reproductor.

7. RESUMEN

La leishmaniosis canina, producida por el protozoo *Leishmania infantum* es una enfermedad con gran potencial zoonótico que se encuentra ampliamente distribuida por la cuenca Mediterránea y el continente americano.

Se trata de una enfermedad sistémica o visceral, lo que significa que puede afectar a numerosos sistemas u órganos, mostrando un gran polimorfismo clínico. El desarrollo de la clínica observada principalmente se produce por dos mecanismos patogénicos. En primer lugar por una inflamación donde se multiplica el parásito que se caracteriza por la presencia de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, dando lugar a las lesiones clínicas en piel, hígado intestino y mucosas. Y, en segundo lugar, las lesiones pueden ser debidas al depósito de inmunocomplejos, dando lugar a signos como uveítis, poliartritis, vasculitis y enfermedad renal, de vital importancia esta última, para la supervivencia del animal.

Debido a esta expresión multisistémica de la infección, y teniendo en cuenta los escasos estudios realizados en órganos del sistema músculoesquelético y reproductivo, en el presente trabajo se planteó un estudio en profundidad de los mismos con el fin de contribuir al conocimiento de su patogenia.

Para ello, se realizó inicialmente una infección experimental con *Leishmania infantum* en perros y a continuación se procedió a confirmar los resultados de la misma mediante el diagnóstico clínico, serológico y molecular en todos los animales.

Una vez obtenidos estos datos y confirmando la infección, se pusieron a punto técnicas de inmunohistoquímica para la detección de células relacionadas con la respuesta inflamatoria, tales como linfocitos y macrófagos, así como la presencia de inmunoglobulinas. Asimismo, se pusieron a punto las técnicas para la detección del parásito en los tejidos mediante inmunohistoquímica y técnicas moleculares.

Posteriormente, se relacionaron las lesiones con la presencia o ausencia del parásito así como con las características clínicas y serológicas, resultado de la infección.

Otro de los objetivos de esta tesis fue el estudio de un método alternativo de diagnóstico del fallo renal, debido a la baja especificidad de los parámetros bioquímicos para valorar la proteinuria renal en estados leves. Actualmente, se considera el fallo renal como el signo de peor pronóstico y principal causa de muerte del animal, generalmente por el depósito de inmunocomplejos y un diagnóstico precoz es indicado como factor fundamental para un tratamiento efectivo. Para este objetivo se consideró el estudio de la proteína NGAL en orina como biomarcador debido a su creciente uso como marcador de fallo renal. Además, este

marcador lo es de procesos inflamatorios y en el presente trabajo también se trató de relacionar con las lesiones observadas en reproductor y muscular.

Los resultados del estudio de NGAL se valoraron en conjunción con las lesiones observadas a nivel renal, especialmente aquellas relacionadas con los glomérulos y los túbulos que podrían sugerir el mecanismo patogénico, y porque, además, la histopatología es actualmente la técnica de referencia para el estudio del fallo renal. Estos resultados se compararon con los valores de UPC y creatinina, los cuales son de uso rutinario en el estudio de fallo renal.

Los resultados obtenidos del primer estudio han demostrado que las lesiones musculares y reproductivas son frecuentes en animales infectados por *Leishmania infantum* y que frecuentemente estas aparecen en ausencia del parásito, especialmente en testículo, lo cual sugiere podrían ser debidas, en parte, a disfunciones inmunitarias.

Por otra parte, el estudio del NGAL ha demostrado que es capaz de detectar proteinuria en estados leves de fallo renal correlacionándose de forma positiva, además, con el daño glomerular valorado mediante histología, lo cual abre la puerta a nuevas opciones clínicas para diagnosticar de forma temprana la enfermedad renal producida por *Leishmania infantum*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abella, V., Scotece, M., Conde, J., Gómez, R., Lois, A., Pino, J., Gómez-Reino, J.J., Lago, F., Mobasheri, A. y Gualillo, O. (2015). The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases. *Biomarkers* 20: 565-571.
- Abranches, P., Silva-Pereira, M. C. D., Conceicao-Silva, F., Santos-Gomes, G. M. and Janz, J. G. (1991). Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *Journal of Parasitology*. 77: 557-561.
- Alexandre-Pires, G., de Brito, M. T., Alguero, C., Martins, C., Rodrigues, O. R., da Fonseca, I. P. y Santos-Gomes, G. (2010). Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 137: 275-283.
- Altet, L., Francino, O., Solano-Gallego, L., Renier, C., Sánchez, A. (2002). Mapping and sequencing of the canine NRAMPI gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infection and Immunity* 70: 2763-2771.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J. and Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*. 57: 1-88.
- Amara, A., I. Mrad, M. K., Melki, M., Mrad, B. y Rejeb, A. (2009). "étude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 160: 54-60.
- Amela C, Suarez B, Isidoro B, Sierra M.J., Santos S, y Simón F. (2012). Evaluación del riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias (CCAES) Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad
- Antoine, J.C., Prina, E., Lang, T. y Courret, N. (1998). The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. *Trends in Microbiology*. 6: 392-401
- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V. y Volf, P. (2013). The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro Surveill*. 18 (30), pii: 20540.
- Aresu, L., Benali, S., Ferro, S., Vittone, V., Gallo, E., Brovida, C. y Castagnaro, M. (2013). Light and electron microscopic analysis of consecutive renal biopsy specimens from leishmania-seropositive dogs. *Veterinary Pathology*. 50: 753-760.
- Awasthi, A., Mathur, R.K. and Saha, B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal Medicine Research*. 119: 238-258.
- Baneth G y Solano-Gallego, L. (2012) Canine Leishmaniasis. En: Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. (ed: Philadelphia: Saunders) 735-748.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*. 24:324-330
- Bangert, M., Llanes-Acevedo I.V., Cruz, S. y Cruz, I. Importancia de la caracterización molecular en un sistema de vigilancia de la leishmaniasis 2017 En: Brote de leishmaniasis en fuenlabrada y otros municipios de la comunidad de Madrid. 2: 159-170
- Barbieri, C.L. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 28: 329-337.
- Barral-Netto, M., Barral, A., Santos, S.B., Carvalho, E.M., R Badaro, R. y H Rocha (1991). Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology* 147: 281-284.
- Benites, A.P., Fernandes, C.E., Brum, K.B., y Abdo, G.S. (2011). Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de caes. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 31:72-77.
- Bihl, F., Pecheur, J., Bréart, B., Cazareth, J., Julia, V., Glaichenhaus, N. y Braud, V.M. (2010). Primed antigen-specific CD4 + T cells are required for NK cell activation in vivo upon *Leishmania major* infection. *The Journal of Immunology*. 185:2174-2181

- Blavier, A., Keroack, S., Denerolle, P., Chabanne, L. y Cadoré, J.L. (2001). Atypical forms of canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal*. 162: 108-20.
- Blot, S. y Fuhrer, L. (1996) Myopathies in domestic carnivores. Part 2. Review of conditions. *The European Journal of Companion Animal*. 6: 56-69.
- Boggiatto, P.M., Ramer-Tait, A.E., Metz, K., Kramer, E.E., Gibson-Corley, K., Mullin, K., Hostetter, J.M., Gallup, J.M., Jones, D.E. y Petersen, C.A. (2010). Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clin Vaccine Immunol*. 17: 267-273.
- Bohan, A. y Peter, J.B. (1975) Polymyositis and dermatomyositis. *New England Journal of Medicine*. 292: 344-347: 404-407.
- Brandonisio, O., Panunzio, M., Faliero, S. M., Ceci, L., Fasanella, A.y Puccini, V. (1996). Evaluation of polymorphonuclear cell and mono-cyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 53: 95–103
- Brinsko, S.P (2004) Fisiología reproductiva domacho. En: Tratado de Fisiología Veterinária, (ed.: Guanabara Koogan). 432–434
- Cabassu, J. P., Gervais, P. y Seguret, N. (1988). Manifestations cliniques de la leishmaniose canine. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*. 23: 29-34.
- Cardoso, V., Mendes Junior, A., Madeira, M., Ferreira, L.C., Figueiredo, F., Rodrigues, F., Oliveira, V., Vasconcellos, R. y Menezes, R.C., (2016). Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. *Parasitology Research*. 2371-2379.
- Carrera, E., Lobrinus, J.A., Spertini, O., Gherardi, R.K. y Kuntzer, T., (2006). Dermatomyositis, lobar panniculitis and inflammatory myopathy with abundant macrophages. *Neuromuscular Disorders*. 16: 468-471.
- Carrillo, E. y Moreno, J. (2009). Cytokine profiles in canine visceral leishman-iasis. *Veterinary Immunology Immunopathology*. 128, 67-70.
- Carvalho Ferreira, A.L., Carregal, V.M., de Almeida Ferreira, S., Leite, R.S., de Andrade, A.S., 2014. Detection of *Leishmania infantum* in 4 different dog samples by real-time PCR and ITS-1 nested PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* . 78: 418–421.
- Castañeda, R., Carpio, I., Asensio, A., Alberdi, J.C., Carcía, S., Domínguez, T. y Moreno, S. (1999). Estudio de la seroprevalencia de la leishmaniosis canina en perros censados en Madrid. *Consulta*. 7: 836-842.
- Castillo, J.A., Sánchez-Acedo, C., Guitierrez, J.F., García, A. y Cortés, A. (1983). Estudio de cepas de *Leishmania donovani* y *L. trópica* en diferentes medios de cultivo. *Revista Ibérica de Parasitología*. 43: 249-257.
- CDC Centers for disease control and prevention. www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J. y Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*. 5: 873-882.
- Cianciolo, R., Hokamp, J. y Nabity, M. (2016). Advances in the evaluation of canine renal disease. *The Veterinary Journal*. 215: 21-29.
- Ciaramella, P., Oliva, G., Luna, R.D., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A. y Persechino, A. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*. 141:539-543
- Ciaramella, P., Pelagalli, A., Cortese, L., Pero, M. E., Corona, M., Lombardi, P., Avallone, L. y Persechino, A. (2005). Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Journal*. 169: 465-467.
- Corrente, M., Franchini, D., Decaro, N., Greco, G., Greco, M. F., Latronico, F., Crovace, A. y Martella, V. (2010) Detection of *Brucella canis* in a dog in Italy. *New Microbiologica*. 33: 337-41
- Cortese, L., Sica, M., Piantadosi, D., Ruggiero, G., Pero, M.E., Terrazzano, G., Mastellone, V. y Ciaramella, P. (2009). Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*. 164: 778-782.

- Costa, D.J., Carvalho, R.M., Abbehusen, M., Teixeira, C., Pitombo, M., Trigo, J., Nascimento, F., Amorim, L., Abreu-Silva, A.L., do Socorro Pires Cruz, M., Miranda, J.C., Fukutani, K., de Oliveira, C.I., Barral, A., Barral Netto, M. y Brodskyn, C. (2013). Experimental infection of dogs with *Leishmania* and saliva as a model to study Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS One*, 8: e60535.
- Costa, F.A., Goto, H., Saldanha, L.C., Silva, S.M., Sinhorini, I.L., Silva, T.C. y Guerra, J.L. (2003). Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology*. 40: 677-684.
- Costagliola, A., Piegari, G., Otrocka-domagala, I., Ciccarelli, D., Iovane, V., Oliva, G., Russo, V., Rinaldi, L., Papparella, S. y Paciello, O. (2016). Immunopathological features of canine myocarditis associated with *Leishmania infantum* Infection. *BioMed Research International*. 1-6.
- Coura-Vital, W., Marques, M.J., Veloso, V.M., Roatt, B.M., Aguiar-Soares, R.D., Reis, L.E., Braga, S.L., Morais, M.H., Reis, A.B. y Carneiro, M. (2011). Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 5:e1291.
- Courtenay, O., Carson, C., Calvo-Bado, L., Garcez, L.M. y Quinnell, R.J. (2014). Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious Dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 8: 26.
- Coutinho, M.T. y Linardi, P.M., (2007). Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?. *Veterinary Parasitology*. 147, 320–325
- Coutinho, M.T., Bueno, L.L., Sterzik, A., Fujiwara, R.T., Botelho, J.R., De Maria, M., Genaro, O., Linardi, P.M. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 128: 149–155.
- Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., G., Ribeiro, V.M., de Paiva-Cavalcanti, M. y Otranto, D. (2012). Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*. 28: 531-538.
- Daval, N., Marchal, C., Guillaumot, L., Hüe, T., Ravel, C., Keck, N. y Kasbari, M. (2016). First report of autochthonous non-vectorial canine leishmaniasis in New Caledonia, south-western Pacific: implications for new control measures and recommendations on importation of dogs. *Parasites & Vectors*. 9: 108.
- Day, M.J.(2011). The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasites & Vectors*. 4: 48.
- De Cesaris P., Filippini A., Cervelli C., Riccioli A., Muci S., Starace G., Stefanini M. y Ziparo E. (1992). Immunosuppressive molecules produced by Sertoli cells cultured in vitro: Biological effects on lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 186:1639-1646.
- Dereure, J., Pratlong, F. y Dedet, J.P. (1999). Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin. En: Canine Leishmaniasis an update. Proceeding of International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, España.18-25.
- Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* .27:305-318.
- DiBartola, S.P. (2000). Clinical approach and laboratory evaluation of renal disease. En: Ettinger, S.J., Feldman, E. Textbook of Veterinary Internal Medicine, 5ª edición. (ed: Saunders) 1600-1614.
- Diniz, S., Melo, M.S., Borges, M., Bueno, R., Reis, B.P., Tafuri, W.L., Nascimento, E.F. y Santos, R.L. (2005). Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Veterinary Pathology*. 42: 650-658.
- Dujardin JC, Campino L, Canavate C, Dedet JP y Gradoni L.(2008) Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 14: e1018.
- Duprey, Z.H., Steurer, F.J., Rooney, J.A., Kirchhoff, L.V., Jackson, J.E., Rowton, E.D. y Schantz, P. M. (2006). Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerging Infectious Diseases* 12: 440-446.
- Engwerda, C.R., Ato, M., Kaye, P.M.,(2004). Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. 20: 524-530.

- Euzeby, J.(1994). Histoire naturelle de la leishmaniose. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 14:97-105.
- Everitt (1989) Statistical Methods for Medical Investigations. Oxford University Press, New York/Edward Arnold, London.
- Fernández-Bellon, H., Solano-Gallego, L., Rodríguez, A., Rutten, V.P., Hoek, A., Ramis, A., Alberola, J. and Ferrer, L. (2005). Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 107: 163-169
- Fernández-Cotrina, J., Iniesta, V., Belinchón-Lorenzo, S., Muñoz-Madrid, R., Serrano, F., Parejo, J., Gómez-Gordo, L., Soto, C., Alonso, C. y Gómez-Nieto, L.(2013). Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniosis by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*. 192: 118-128.
- Ferrer, L. (1992). Leishmaniasis. En: Kirk RW, Bonagura JD. Kirk's current veterinary therapy XI. (ed: Saunders). 266-270.
- Ferrer, L. (2002) The pathology of canine leishmaniasis: canine *leishmaniasis*-moving toward solution. En: Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum.. Sevilla, España. 37-38
- Floglia-Manzillo V, (2006). Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis .*Veterinary Record*. 158:690-694.
- Foglia Manzillo, V., Oliva, G., Pagano, A., Manna, L., Maroli, M. y Gradoni, L. (2006). Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Veterinary Parasitology*. 142: 142-145.
- Font, A., Mascort, J., Altimira, J., Closa, J.M. and Vilafranca, M. (2004). Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*. 45: 199-201.
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodríguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A. and Roura, X. (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 137: 214-221.
- Freitas, J.C., Nunes-Pinheiro, D.C., Lopes Neto, B.E., Santos, G.J., Abreu, C.R., Braga, R.R., Campos, M. and Oliveira, L.F. (2012). Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 45: 24-29.
- Gállego, M., Pratlong, F., Fisa, R., Riera, C., Rioux, J.A., Dedet, J.P. y Portús, M. (2001). The life-cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum* zymodemes in the Old World. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 95: 269-271.
- Gálvez, R., Descalzo, M.A., Miró, G., Jiménez, M.I., Martín, O., Dos Santos-Brandao, F., Guerrero, I., Cubero, E. y Molina, R. (2010). Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and Leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Tropica*. 115: 95-102.
- García-Alonso, M., Nieto, C.G., Blanco, A., Requena, J.M., Alonso, C. y Navarrete, I. (1996). Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunology*. 18: 539-546.
- García-Martínez, J.D., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Caldin, M., Cerón, J.J.(2015). Urinary ferritin and cystatin C concentrations at different stages of kidney disease in leishmaniotic dogs. *Research in Veterinary Science*. 99: 204–207.
- García-martínez, J.D., Tvarijonaviciute, A., Cerón, J.J., Caldin, M., Martínez-subiela, S., 2012. Urinary clusterin as a renal marker in dogs. *Research in Veterinary Science*. 1-6.
- Garg, R. y Dube, A. (2006). Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research* 123: 439-454.
- Gilbert, M.T.P., Haselkorn, T., Bunce, M., Sanchez, J.J., Lucas, S.B., Jewell, L.D., van Marck, E. y Worobey, M., 2007. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS One* 2: e537.
- Ginel, P.J., Camacho, S. and Lucena, R. (2008). Anti-histone antibodies in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis. *Research in Veterinary Science*. 85: 510-514.

- Giunchetti, R.C., Martins-Filho, O., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Marques, M.J., Tafuri, W.L., Corrêa-Oliveira, R. y Reis, A.B. (2008). Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology Immunopathology*. 121: 23-33.
- Gomes De Oliveira I, V.V., Simone, I., Barros De Macedo, R., Flávio, I., De, R., Ii, A., Alberto, C., Ramos, N., Rafael, I., Nascimento, A., Iii, R., Lyra, F.C., Iii, M., Câmara, L., Iii, A., Amaro, V., Junior, D.S. (2016). Histopathological evaluation and parasite quantification (qPCR) in the male dog's genital system after natural infection. *Ciência Rural, Santa Maria*. 46: 641-647.
- Gomes, A.A., Laurenti, M.D., Ferraro, G.C., de Camargo, M.H.B., Costa, D.C., Machado, G.F., Perri, S.H.V. y Marcondes, M. (2012). Subclinical muscle injuries in dogs infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. *Brazilian Journal Veterinary Pathology*. 5: 108-115.
- Gomes-Silva, A., Valverde, J.G., Ribeiro-Romão, R.P., Plácido-Pereira, R.M. y DACruz, A.M. (2013). Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology*, 140: 771-779.
- Gómez-Nieto, C., Navarrete, I., Habela, M. y Hernández-Rodríguez' S. (1992). Seroprevalence of canine leishmaniasis around Cáceres, Spain. *Preventive Veterinary Medicine*. 13: 173-178
- Gómez-Ochoa, P., Castillo, J. a, Lucientes, J., Gascón, M., Zarate, J.J., Arbea, J.I., Larraga, V. y Rodriguez, C., (2003). Modified direct agglutination test for simplified serologic diagnosis of leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 10: 967-68.
- Gómez-Ochoa, P., Lara, A., Couto, G., Marcen, J. M., Peris, A., Gascon, M. y Castillo, J. A. (2010). The nitroblue tetrazolium reduction test in canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* .172: 135-138.
- Gonzalez,J.L. (1983). Testicular amyloidosis in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. *British Journal of Experimental Pathology*. 64: 518-523
- Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*. 181: 23-30.
- Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181, 23-30.
- Grauer, F y Gregory. (2011). Proteinuria: Measurement and Interpretation. *Topics in companion animal medicine*. 26: 121-7
- Grimm, F., Brun, R. & L. Jenni.1991. Promastigote infectivity in *Leishmania infantum*. *Parasitol. Res.* 77:185-191.
- Guerbouj, S., Chemkhi , J., Kaabi, B., Rahali, A., Ismail, R., Guizani, I. (2007). Natural infection of *Phlebotomus (Larrousius) langeroni* (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania infantum* in Tunisia. *Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. 101:372-377.
- Guilvard E., Gallego M., Moreno G. , Fisa R., Rispail P., Pratlong F., Martinez-Ortega E., Gallego J. y Rioux J.A (1996) Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* (Diptera-Psychodidae) par *Leishmania infantum* (Kinetoplastida-Trypanosomatidae) en Catalogne (Espagne) *Parasite*. 3: 191-192
- Gutiérrez, M., Guevara, J., y Barrera, L. (2012). Semi-automatic grading system in histologic and immunohistochemistry analysis to evaluate in vitro chondrogenesis. *Universitas Scientiarum*. 17: 167-178.
- Handman, E. 2001. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 229-243.
- Harith, A., Salappendel, R., Reiter, L., Knapen, F., Korte, P., Huigen, E., Kolk, R., 1989. Application of a direct agglutination test for detection of specific-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2252–2257.
- Hernández, L.,Montoya, A.,Checa, R.,Dado, D., Gálvez, R., Otranto, D., Latrofa, M., Baneth, Miró, G. (2015) Course of experimental infection of canine leishmaniosis: Follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques *Veterinary Parasitology*. 207 :149–155
- Hide, M., Bañuls, A.L. and Tibayrenc, M. (2001). Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology*, 123, 425-432.
- Hide, M., Bañuls, A.L. y Tibayrenc, M. (2001). Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology*. 123: 425-432.

- Hoshein, S., Blake, D.P. y Solano-Gallego, L. (2016). Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology* 1-21.
- Hoshein, S., Blake, D.P. y Solano-Gallego, L. (2016). Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology* .1-21.
- Hsu, W., Lin, Y., Hu, Y., Wong, M., Lin, F. y Lee, Y. (2014). Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in dogs with naturally occurring renal diseases *Journal of Veterinary Internal Medicine*.28: 437-442.
- International renal interest society, IRIS (2015). Staging of CKD Novartis Animal Health. 1-8.
- IRIS (2015). International Renal Interest Society IRIS. Staging of cronic kidney disease (modified 2015) <http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.html>
- José-López, R., la Fuente, C.D. and Añor, S. (2012). Presumed brain infarctions in two dogs with systemic leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, 53, 554-557.
- Jubb, Kennedy, and Palmer's. (2015). En: Pathology of domestic animal. Volumen 1. 6ª edición. (ed: Elsevier)
- Karkamo, V., Kaistinen, A., Näreaho, A., Dillard, K., Vainio-Siukola, K., Vidgrén, G. y Anttila, M. (2014). The first report of autochthonous non-vector-borne transmission of canine leishmaniosis in the Nordic countries. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 56: 84.
- Kenney, R. T., Sacks, D. L., Sypek, J. P., Vilela, L., Gam, A. A. y K. Evans-Davis.(1999). Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 163: 4481-4488.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*. 4: 1-24.
- Kornegay, N.J., Gorgacz, J.E., Dawe, C.D., Bowen, M.J., White, A.N. y Debuysscher, V.E. (1980) Polymyositis in dogs. *Journal of American Veterinary Medicine*. 176: 431-438.
- Koutinas, A.F. y Koutinas, C. K. (2014). Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Veterinary Pathology*. 51: 527-38.
- Kumar, H., Kawai, T. y Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.388: 621–625.
- Lambson, B. y Barker, C.(2002). Homologous minicircles in *Leishmania donovani*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 96: 75–80.
- Leandro, C., Santos-Gomes, G.M., Campino, L., Romão, P., Cortes, S., Rolão, N., Gomes-Pereira, S., Riça Capela, M.J. y Abranches, P. (2001). Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 79: 273-284.
- Lima, W.G., Oliveira, P.S., Caliri, M.V., Gonçalves, R., Michalick, M.S., Melo, M.N. y Tafuri, W.L. (2007). Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117, 129-136.
- Louzir, H. y Dellagi, K. (1999). Les leishmanioses : un modèle d'étude des interactions hôte-parasite ; implication pour la maladie humaine. *Inst. Pasteur de Tunis*. 10: 67-80.
- Lucientes, J. (2017). Los flebotomos vectores de la leishmaniosis en España. En: Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la comunidad de Madrid (ed: elsevier) 17-23
- Maia, C. y Campino, L., (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*. 158: 274-287.
- Maia, C. y Cardoso, L. (2015). Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Veterinary Parasitology*. 213: 2-11.
- Maia, C., Nunes, M., Cristóvão, J. y Campino, L. (2010). Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Tropica*. 116: 193-199.

- Makni, S., Ayed, K., Ben Said, M. y Ben Rachid, M.S. (1989). Study of circulating immune complexes during the evolution of visceral Mediterranean leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*, 83, 349-355.
- Mancianti, F. y Sozzi, S. (1995). Isolation of *Leishmania* from a newborn puppy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 89: 402.
- Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L. y Pieri, S. (1988). Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 82, 566- 567.
- Manna, L., Corso, R., Galiero, G., Cerrone, A., Muzj, P. y Gravino, A.E., (2015). Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasites & Vectors* .1:9.
- Manna, L., Paciello, O., Morte, R. y Gravino, A.E.(2012). Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis : case report. *Parasites & Vectors*. 5: 1.
- Manna, L., Reale, S., Picillo, E., Vitale, F. y Gravino, A.E. (2008). Interferon-gamma (INF-gamma), IL4 expression levels and *Leishmania* DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol. *Cytokine*. 44:288-292.
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Picillo, E., Pavone, L.M. y Gravino, A.E. (2008). Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The Veterinary Journal*. 177: 279-282.
- Marcondes, M., Biondo, A.W., Gomes, A.A., Silva, A.R., Vieira, R.F., Camacho, A.A., Quinn, J. and Chandrashekar, R. (2011a). Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Vet Parasitol*, 175, 15-19.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology* . 27, 123–147.
- Martínez, J.E., Valderrama, L., Gama, V., Leiby, D.A. y Saravia, N.G.(2000). Clonal diversity in the expression and stability of the metastatic capability of *Leishmania guyanensis* in the golden hamster. *Journal of Parasitology*. 86:792-799.
- Martínez-Subiela, S., García-Martínez, J.D., Tvarijonaviciute, A., Tecles, F., Caldin, M., Bernal, L.J., Cerón, J.J., (2013). Urinary C reactive protein levels in dogs with leishmaniasis at different stages of renal damage. *Research in Veterinary Science*. 95, 924–929.
- Martin-Sanchez J, Guilvard E, Acedo-Sanchez C, Wolf- Echeverri M, Sanchiz-Marin MC, Morillas-Marquez F. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (southern Spain). *International Journal for Parasitology*. 1994; 24(3):405-408
- Mauricio, I.L., Stothard, J.R. y Miles, M.A. (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* .16: 188-189
- Mc Kenzi, G.J., Emson, C.L., Bell, S.L., Anderson, S., Fallon, P., Zurawski, G., Murray, R., Grencis, R. y McKenzie, A.N.J. (1998). Impaired development of TH₂ cell in IL-13- deficient mice. *Immunity*. 9: 420-426.
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H. y Deplazes, P. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immuno- fluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 5515-5519.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G. y Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis : part two. *Trends in Parasitology*. 24: 371-377.
- Miró, G., Montoya, A., Roura, X., Gálvez, R. y Sainz, A. (2013). Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. *Parasites & Vectors*. 6, 117.
- Miró, G., y Molina, R. (2006). Leishmaniosis canina: Manejo clínico y situación actual en España. *Bayer HealthCare Edición*: 114

- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J. y Alvar, J. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. 88: 491-493.
- Moody, M.E., Mueller, L.D., y Soltis, D.E. (1993). genetic variation and random drift in autotetraploid populations. *Genetics*. 134: 649-657.
- Moreira, M., Luvizotto, M., Garcia, J., Corbett, C. y Laurenti, M. (2007). Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*. 145: 245-252.
- Moreno, J. and Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitology*, 18, 399-405.
- Mori K y Nakao K. (2007). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int* 71:967-970,
- Mori K, Nakao K.(2007) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int*. 71:967-970
- Muller, K., Van Zandbergen, G., Hansen, B., Laufs, H., Jahnke, N., Solbach, W. y Laskay, T. (2001). Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Medical Microbiology and Immunology*. 190:73–76.
- Nabity, M.B., Lees, G.E., Cianciolo, R., Boggess, M.M., Steiner, J.M. y Suchodolski, J.S., (2012). Urinary biomarkers of renal disease in dogs with X-linked hereditary nephropathy *Journal of Veterinary Internal Medicine*: 282-293.
- Naucke TJ, Lorentz S. (2012). First report of venereal and vertical trans- mission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors*. 5:67.
- Nicolas, L., Prina, E. y Lang, T. (2002). Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *Journal Clinical Microbiology*. 40: 1666–1669.
- Nieves, E. y Rondón, M. (2007). Sobrevivencia del parásito *Leishmania* en el insecto vector: interacciones moleculares. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 27: 66-72
- Noli, C. y Saridomichelakis, M.N. (2014). An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Veterinary Journal*. 202: 425-435.
- Nylen, S., y Sacks, D (2007): Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends in Immunology*. 28: 378-384.
- Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T. y Gradoni, L. (2006). Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 1318-1322.
- Ordeix i Esteve, L. y Fondati, A. (2013). Manifestaciones clínicas cutáneas.En: Leishmaniosis. Una revisión actualizada (ed. Servet). 69-95.
- Paciello, O., Oliva, G., Gradoni, L., Manna, L., Manzillo, V. F., Wojcik, S., Trapani, F. y Papparella, S. (2009). Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania Infantum* infection. *Neuromuscular Disorders*. 19: 124-30.
- Paciello, O., Wojcik, S., Gradoni, L., Oliva, G., Trapani, F., Iovane, V., Politano, L. y Papparella, S., (2010). Syrian hamster infected with *Leishmania infantum*: a new experimental model for inflammatory myopathies. *Muscle & Nerve*. 41: 355-361.
- Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M., Crotti, A., Maroli, M., Oliva, G., Roura, X., Zatelli, A. y Zini, E. (2010a). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 236: 1184-91.
- Pardo-Marín, L., Martínez-Subiela, S., Pastor, J., Tvarijonaviciute, A., Garcia-Martinez, J.D., Segarra, S., Cerón, J.J. (2016). Evaluation of various biomarkers for kidney monitoring during canine leishmaniosis treatment. *BMC Veterinary Research*. 13, 31.

- Peña, M.T., Roura, X. and Davidson, M.G. (2000). Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Veterinary Ophthalmology*, 3: 35-41.
- Perego, R., Proverbio, D., De Giorgi, G., y Spada, E. (2014). Prevalence of dermatological presentations of Canine Leishmaniasis in a nonendemic area : a retrospective study of 100 Dogs. *Veterinary Medicine International*. 2014:1-5.
- Pereira, B.A. y Alves, C.R. (2008). Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Veterinary Parasitology*. 158: 239-255.
- Playfair, J., Bancroft, G., (2013) T cells and the MHC, En: *Infection & immunity*. Oxford University press, 159-171
- Porrozzzi, R., Santos, M. V, Teva, A., Ferreira, A.L., Santos, C.D., Fernandes, A.P., Gazzinelli, R.T., Campos-neto, A. y Grimaldi, G., (2007). Comparative evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*. 14: 544–548.
- Pou-Barreto, C., Serafín-Pérez, I., Fernández-Serafín, C., Carretón, E., González- Miguel, J., Montoya-Alonso, J., Simón, F., Valladares, B. and Morchón, R. (2013). Prevalencia en perros infectados por *Leishmania* en la Isla de Tenerife (Islas Canarias). En: XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología. 153
- Quineell, R.J. y Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136: 1915-1934.
- Ready, P.D. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*, 6, 147-154
- Rioux JA, Lanotte G, Maazoun R, Perello R, Pratlong F. (1980) *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, the agent of the autochthonous oriental sore. Apropos of the biochemical identification of 2 strains isolated in the eastern Pyrenees. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences. Serie D: Sciences Naturelles*. 291:701-3.
- Rodríguez Sosa, M., Rosas, L.E., Mc Kenezie, A.N.J. y A.R. Satoskar. (2001). IL-13 gene deficient mice are susceptible to cutaneous *L. mexicana* infection. *European Journal of Immunology*. 31:3255- 3260.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., López-Fuertes, L., Timón, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sánchez-Robert, E., Francino, O. y Alberola, J. (2007). A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *International Journal for Parasitology*. 37: 683-693.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., López-Fuertes, L., Timón, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sánchez-Robert, E., Francino, O. y Alberola, J. (2007). A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *International Journal for Parasitology*. 37: 683-93.
- Rodríguez-cortés, A., Ojeda, A., Todolí, F. y Alberola, J., (2013). Veterinary Parasitology Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect *Leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. 191: 363-366.
- Rolao, N., Cortes, S., Rodrigues, O.R. y Campino, L. (2004). Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Parasitology*. 90: 1150-1154.
- Rosypal, A.C., Troy, G.C., Zajac, A.M., Frank, G. y Lindsay, D.S. (2005). Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *Journal Parasitology*. 91:970-972.
- Sacks, D. y Perkins, P. (1984). "Identification of an infective state of *Leishmania* promastigotes. *Science*. 223: 1417
- Sacks, D. y Sher, A. (2002). Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunology*. 3: 1041-1047.
- Sakkas, L.I., Boulbou, M., Kyriakou, D., Makri, I., Sinani, C. y Germanis, A. (2008). Immunological features of visceral leishmaniasis may mimic systemic lupus erythematosus. *Clinical Biochemistry*. 41:65–8.
- Sanchez, M.A., Diaz, N.L., Zerpa, O., Negron, E., Convit, J. y Tapia, F.J. (2004). Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70: 618-624.

- Santos-Gomes, G.M., Rosa, R., Leandro, C., Cortes, S., Romão, P. y Silveira, H. (2002). Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 88, 21-30.
- Saridomichelakis, M.N. (2009). Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*. 20: 471-489.
- Schallig, H.D., Cardoso, L. and Semião-Santos, S.J. (2013). Seroepidemiology of canine leishmaniasis in Évora (southern Portugal): 20-year trends. *Parasites & Vectors*. 6,:100.
- Schallig, H.D., Schoone, G.J., Beijer, E.G., Kroon, C.C., Hommers, M., Ozbek, Y., Ozensoy, S., da Silva, E.S., Cardoso, L.M. and da Silva, E.D. (2002). Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Veterinary Parasitology*. 109, 1-8.
- Schleicher, U., Liese, J., Knippertz, I., Kurzmann, C., Hesse, A., Heit, A., Fischer, J.A.A., Weiss, S., Kalinke, U., Kunz, S. y Bogdan, C. (2007). NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *The Journal of Experimental Medicine*. 204: 893-906.
- Senghor, M.S., Faye, M.N., Faye, B., Diarra, K., Elguero, E., Gaye, O., Bañuls, A.L. y Niang, A.A. (2011). Ecology of Phlebotomine sand flies in the rural community of Mont Rolland (Thiès Region, Senegal): Area of Transmission of Canine Leishmaniasis. *PLoS ONE*. 6: e14773.
- Setchell B.P. y Breed W.G.(2006). Anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract. En: *Physiology of Reproduction*. (ed. Elsevier). 771-808.
- Setchell, B.P., Uksila, J., Maddocks, S. y Pöllänen P.(1990) Testis physiology relevant to immunoregulation. *Journal of Reproductive Immunology*. 18:19-32
- Sharma, U. y Singh, S. (2009). Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology*. 47:412-423.
- Slappendel, R. J. (1988). Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *Veterinary Quarterly* 10:1-16.
- Slappendel, R.J. y Greene, C.E. (1990). Leishmaniasis. En: Greene, C.E. (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. Saunders Company, Philadelphia. 769-777
- Solano-gallego, L., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Koutinas, A., Miro, G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. y Baneth, G. (2009) Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 165: 1-18.
- Solano-Gallego, L. y Villanueva, S. (2013). Diagnóstico. En: *Leishmaniasis. Una revisión actualizada* (ed. Servet). 131-150
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. y Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 165: 1-18.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. y Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 4:86.
- Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T. y Natale, A. (2014). Serological diagnosis of canine leishmaniasis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and Leishmania 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. *Parasites & Vectors*. 7: 111.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L. y Baneth, G. (2004). Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of Infectious Diseases*. 189: 1729-1733.
- Tabar, M.D., Roura, X., Francino, O., Altet, L. and Ruiz de Gopegui, R. (2008). Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *Journal of Small Animal Practice*. 49: 325-328.
- Tafuri, W., Santos, R., Arantes, R., Gonçalves, R., Melo, M., Michalick, M. y Tafuri, W. (2004). An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal. Immunology Methods*. 292: 17-23.

- Tafuri, W.L., de Oliveira, M.R. y Melo, M.N. (2001). Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology*. 96: 203-212.
- Teixeira, M.J., Teixeira, C.R., Andrade, B.B., Barral-Netto, M. y Barral, A. (2006). Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. 22:32-40.
- Turchetti, A.P., Souza, T.D., Paixão, T.A. y Santos, R.L. (2014). Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 8:403-407.
- Valberg, S. (2008) En: Clinical Biochemistry of domestic animals. Skeletal Muscle Functions.(ed:Elsevier) 459-480.
- Vamvakidis, C.D., Koutinas, F., Kanakoudis, G., Georgiadis, G. y Saridomichelakis, M., (2000). Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Veterinary Record*. 146: 698-703.
- Van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., y Laskay, T., (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *The Journal of Immunology*. 173: 6521-6525.
- Villanueva, S., Ordeix, L. y Solano-Gallego, L. (2013). Patogénesis y respuesta inmunitaria. En: Leishmaniosis, una revisión actualizada. (ed: Servet). 33-50.
- Vinge, L., Lees, G.E., Nielsen, R., Kashtan, C.E., Bahr, A. y Christensen, E. (2010) The effect of progressive glomerular disease on megalin-mediated endocytosis in the kidney. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 8: 2458-2467,
- Vitu, C; Sanchis, R y Oiauffret, A. (1973) Evolution des protéines sériques dans la leishmaniose canino. *Comptes Rendus Biologies*. 167: 513-518.
- Volf, P., Hostomska, J., Rohousova, I. (2008). Molecular crosstalks in *Leishmania* sandfly host relationships. *Parasite*. 15: 237–243.
- WHO (2010). The leishmaniasis: Report of a WHO Expert Committee Geneva:World Health Organization, 1984.
- WHO (2016). Leishmaniasis in high burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Weekly epidemiological record* 91: 287-296
- WHO (2017) Leishmaniasis. Fact sheet, Updated April 2017.
- Xavier, S.C. (2006). Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Veterinary Research*. 22: 1-7.
- Zatelli, A., Borgarelli, M., Santilli, R., Bonfanti, U., Nigrisoli, E., Zanatta, R., Tarducci, A. y Guarraci, A. (2003). Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *American Journal of Veterinary Research*. 64: 558-561.

9. ANEXOS

Tabla 1-Anexos. Descripción de los signos clínicos y puntuación clínica total (PC) por animal

ID	Peso	Ocular	Piel	Nód. Linf.	Mucosas	Onic	Atrofia	Esplenom.	PC
1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
2	0	0	0	1	1	0	0	0	2
3	0	0	0	1	0	0	0	0	1
4	1	0	0	1	0	0	0	0	2
5	2	0	1	1	1	1	1	1	8
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	2	1	2	1	1	0	1	1	9
8	0	1	1	1	1	0	1	1	6
9	2	2	2	1	1	1	1	1	11
10	2	1	2	1	1	1	1	1	10
11	1	2	0	1	1	0	1	1	7
12	0	0	1	1	1	0	0	0	3
13	0	0	1	1	0	0	0	0	2
14	0	0	0	1	0	0	0	0	1
15	0	0	1	1	1	0	0	1	4
17	0	0	1	1	1	0	0	0	3
18	1	2	0	1	0	0	0	1	5
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1	0	0	0	1	0	0	0	2
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	1	0	0	1	1	0	1	0	4
26	0	1	2	1	0	0	0	1	5
27	0	0	0	1	1	0	0	0	2
28	1	0	2	1	1	0	0	1	6
29	1	0	1	0	0	0	0	0	2
30	0	1	1	1	0	0	0	0	3

ID	Peso	Ocular	Piel	Nód. Linf.	Mucosas	Onic	Atrofia	Esplenom.	PC
31	0	0	1	0	0	0	1	0	2
32	1	1	0	0	0	0	0	0	2
33	1	0	2	1	0	0	1	0	5
34	2	0	1	0	0	0	0	0	3
35	0	0	1	0	1	0	0	0	2
36	1	1	0	0	0	0	0	0	2
37	0	1	0	0	0	0	0	0	1
38	0	2	0	1	0	0	0	0	3
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	1	0	0	0	0	0	0	1
41	0	0	0	1	0	0	0	0	1
42	1	1	1	0	0	0	1	0	4
43	1	0	0	0	0	0	0	0	1
44	1	0	0	0	0	0	0	0	1
45	0	0	0	1	0	0	0	0	1
46	0	0	1	0	0	0	0	0	1
47	0	0	1	1	0	0	1	0	3
48	1	2	2	0	1	0	1	0	7
49	1	0	1	0	0	0	0	1	3
50	1	2	1	0	1	0	1	0	6
51	2	2	2	1	1	0	1	1	10
52	0	0	1	0	0	0	1	0	2
53	0	0	0	0	0	0	1	0	1
54	2	2	1	1	0	0	0	1	7
55	1	0	1	0	0	0	0	0	2
56	1	1	0	1	0	0	0	1	4
57	1	1	0	0	0	0	1	0	3
58	1	0	0	0	0	0	1	0	2

Tabla 2-Anexos Descripción de los perros por sexo, estado clínico y puntuación total de la clínica

ID	SEXO	Clasificación	CLIN/SUB	PC
1	♀	Asintomático	Subclínico	1
2	♀	Asintomático	Subclínico	2
3	♂	Asintomático	Subclínico	1
4	♂	Asintomático	Subclínico	2
5	♂	Polisintomático	Clínico	8
6	♀	Asintomático	Subclínico	0
7	♀	Polisintomático	Clínico	9
8	♂	Polisintomático	Clínico	6
9	♂	Polisintomático	Clínico	11
10	♂	Polisintomático	Clínico	10
11	♂	Polisintomático	Clínico	7
12	♀	Oligosintomático	Clínico	3
13	♀	Oligosintomático	Clínico	2
14	♂	Asintomático	Subclínico	1
15	♂	Oligosintomático	Clínico	4
17	♀	Oligosintomático	Clínico	3
18	♂	Oligosintomático	Clínico	5
19	♂	Asintomático	Subclínico	0
20	♂	Asintomático	Subclínico	2
21	♀	Asintomático	Subclínico	0
22	♀	Asintomático	Subclínico	0
23	♂	Asintomático	Subclínico	0
24	♀	Asintomático	Subclínico	0
25	♀	Oligosintomático	Clínico	4
26	♂	Polisintomático	Clínico	5
27	♂	Asintomático	Subclínico	2
28	♂	Polisintomático	Clínico	6
29	♀	Asintomático	Subclínico	2
30	♀	Oligosintomático	Clínico	3

ID	SEXO	Clasificación	CLIN/SUB	PC
31	♀	Oligosintomático	Clínico	2
32	♂	Oligosintomático	Clínico	2
33	♂	Polisintomático	Clínico	5
34	♀	Oligosintomático	Clínico	3
35	♂	Oligosintomático	Clínico	2
36	♀	Oligosintomático	Clínico	2
37	♂	Asintomático	Subclínico	1
38	♂	Oligosintomático	Clínico	3
39	♀	Asintomático	Subclínico	0
40	♂	Asintomático	Subclínico	1
41	♀	Asintomático	Subclínico	1
42	♀	Oligosintomático	Clínico	4
43	♂	Asintomático	Subclínico	1
44	♂	Asintomático	Subclínico	1
45	♀	Asintomático	Subclínico	1
46	♂	Asintomático	Subclínico	1
47	♀	Oligosintomático	Clínico	3
48	♂	Polisintomático	Clínico	7
49	♀	Oligosintomático	Clínico	3
50	♀	Polisintomático	Clínico	6
51	♂	Polisintomático	Clínico	10
52	♂	Oligosintomático	Clínico	2
53	♀	Asintomático	Subclínico	1
54	♀	Polisintomático	Clínico	7
55	♂	Asintomático	Subclínico	2
56	♂	Polisintomático	Clínico	4
57	♂	Oligosintomático	Clínico	3
58	♀	Oligosintomático	Clínico	2

Tabla 3-Anexos. Descripción y distribución de los resultados de IFI y ELISA.

ID	SEXO	IFI			ELISA		
		Titulaci ón	Grupo	Resulta do	Titulaci ón	Grupo	Resulta do
1	♀	1/1280	3	POS	2,560	2	POS
2	♀	1/1280	3	POS	4,390	3	POS
3	♂	1/1280	3	POS	2,770	2	POS
4	♂	1/80	2	POS	0,610	1	NEG
5	♂	1/1280	3	POS	4,640	3	POS
6	♀	1/1280	3	POS	4,010	3	POS
7	♀	1/1280	3	POS	4,890	3	POS
8	♂	1/160	2	POS	2,310	2	POS
9	♂	1/1280	3	POS	4,200	3	POS
10	♂	1/160	2	POS	4,660	3	POS
11	♂	1/160	2	POS	4,890	3	POS
12	♀	1/1280	3	POS	4,890	3	POS
13	♀	1/160	2	POS	1,990	2	POS
14	♂	1/320	3	POS	2,050	2	POS
15	♂	1/320	3	POS	5,000	3	POS
17	♀	1/320	3	POS	3,000	2	POS
18	♂	1/320	3	POS	2,560	2	POS
19	♂	1/320	3	POS	2,660	2	POS
20	♂	1/1280	3	POS	4,070	3	POS
21	♀	0	1	NEG	0,150	1	NEG
22	♀	0	1	NEG	0,290	1	NEG
23	♂	0	1	NEG	0,200	1	NEG
24	♀	1/1280	3	POS	2,330	2	POS
25	♀	1/320	3	POS	1,990	2	POS
26	♂	1/1280	3	POS	3,730	2	POS
27	♂	1/160	2	POS	1,090	1	POS
28	♂	1/1280	3	POS	4,340	3	POS
29	♀	1/160	2	POS	5,180	3	POS
30	♀	1/160	2	POS	5,760	3	POS

ID	SEXO	IFI			ELISA		
		Titulaci ón	Grupo	Resulta do	Titulaci ón	Grupo	Resulta do
31	♀	1/80	2	POS	3,530	2	POS
32	♂	1/80	2	POS	4,080	3	POS
33	♂	1/320	3	POS	6,580	3	POS
34	♀	1/320	3	POS	6,470	3	POS
35	♂	1/80	2	POS	1,750	2	POS
36	♀	0	1	NEG	0,510	1	NEG
37	♂	1/80	2	POS	2,680	2	POS
38	♂	1/160	2	POS	4,720	3	POS
39	♀	1/160	2	POS	5,570	3	POS
40	♂	1/320	3	POS	3,970	2	POS
41	♀	1/320	3	POS	6,620	3	POS
42	♀	1/160	2	POS	6,790	3	POS
43	♂	80	2	POS	2,340	2	POS
44	♂	1/160	2	POS	4,730	3	POS
45	♀	1/80	2	POS	6,880	3	POS
46	♂	1/320	3	POS	5,950	3	POS
47	♀	0	1	NEG	0,290	1	NEG
48	♂	1/320	3	POS	4,760	3	POS
49	♀	0	1	NEG	0,330	1	NEG
50	♀	1/160	2	POS	6,880	3	POS
51	♂	1/1280	3	POS	7,040	3	POS
52	♂	1/80	2	POS	2,380	2	POS
53	♀	1/160	2	POS	5,180	3	POS
54	♀	1/320	3	POS	4,630	3	POS
55	♂	1/80	2	POS	1,130	2	POS
56	♂	1/40	2	POS	3,360	2	POS
57	♂	0	1	NEG	0,600	1	NEG
58	♀	1/20	1	NEG	0,380	1	NEG

Tabla 4-Anexos. Resultados de qPCR individual. Carga parasitaria nódulo linfático y médula. Parásitos por mg de tejido (Céls/mg). Positivo (POS), negativo (NEG).

ID	qPCR Nódulo linfático		qPCR Médula	
	Céls/mg	Resultado	Céls/mg	Resultado
1	0	NEG	244804	POS
2	108597	POS	4211715	POS
3	11769	POS	0	NEG
4	0	NEG	0	NEG
5	1461382	POS	11295289	POS
6	136986	POS	4497225	POS
7	2052516	POS	29475504	POS
8	49995	POS	5788973	POS
9	25350	POS	2471762	POS
10	0	NEG	670765	POS
11	0	NEG	459800	POS
12	0	NEG	529807	POS
13	6047	POS	0	NEG
14	27368	POS	8779	POS
15	285064	POS	9697676	POS
17	0	NEG	11132	POS
18	0	NEG	0	NEG
19	0	NEG	210285	POS
20	1123	POS	118697	POS
21	0	NEG	0	NEG
22	0	NEG	0	NEG
23	0	NEG	0	NEG
24	0	NEG	0	NEG
25	0	NEG	0	NEG
26	57220	POS	716234	POS
27	0	NEG	0	NEG
28	122954	POS	2192328	POS
29	28006407	POS	1485004	POS
30	3119875	POS	2716716	POS

ID	qPCR Nódulo linfático		qPCR Médula	
	Céls/mg	Resultado	Céls/mg	Resultado
31	714992	POS	643407	POS
32	12017287	POS	1528080	POS
33	1088975	POS	19034218	POS
34	6837651	POS	204557240	POS
35	200424	POS	0	NEG
36	0	NEG	0	NEG
37	14537411	POS	39370809	POS
38	0	NEG	0	NEG
39	236829304	POS	34143062	POS
40	1251989	POS	15470377	POS
41	1069790	POS	11937750	POS
42	1525427	POS	51111250	POS
43	511275	POS	13338680	POS
44	5800969	POS	431148	POS
45	1950236	POS	980978	POS
46	5517828	POS	20914101	POS
47	148738	POS	0	NEG
48	239493	POS	1228657	POS
49	0	NEG	0	NEG
50	622034	POS	450891885	POS
51	18143893	POS	275781	POS
52	22807543	POS	5225656	POS
53	8671350	POS	2440478	POS
54	398897	POS	2457987	POS
55	388	POS	112449	POS
56	385304	POS	150558	POS
57	0	NEG	0	NEG
58	243057860	POS	0	NEG

Tabla 5-Anexos Puntuación clínica total (PC), histopatología (HE) de cada animal detallando el tipo y la intensidad de las lesiones de los animales que presentaron lesión en tejido muscular

ID	PC	Signos clínicos asociados	HE	
			Intensidad de la lesión	Tipo de la lesión
1	1	Sin pérdida de peso ni atrofia muscular	Sin lesión	Sin lesión
2	2	Sin pérdida de peso ni atrofia muscular	Células inflamatorias aisladas o pequeños focos de inflamación	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
3	1	Sin pérdida de peso ni atrofia muscular	Sin lesión	Sin lesión
5	8	Pérdida de peso >20%, con atrofia muscular	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
6	0	Sin pérdida de peso ni atrofia muscular	Presencia de dos o más focos inflamatorios de pequeño a moderado tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
7	9	Pérdida de peso >20%, con atrofia muscular	Presencia de dos o más focos inflamatorios de pequeño a moderado tamaño	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
8	6	Sin pérdida de peso, con atrofia muscular	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
9	11	Pérdida de peso >20%, con atrofia muscular	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
10	10	Pérdida de peso >20%, con atrofia muscular	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
11	7	Pérdida de peso <20%, con atrofia muscular	Presencia de dos o más focos inflamatorios de pequeño a moderado tamaño	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
13	2	Sin pérdida de peso ni atrofia muscular	Sin lesión	Sin lesión
14	1	Sin pérdida de peso ni atrofia muscular	Sin lesión	Sin lesión
15	4	Sin pérdida de peso, con atrofia muscular	Células inflamatorias aisladas o pequeños focos de inflamación	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
17	3	Sin pérdida de peso ni atrofia muscular	Sin lesión	Sin lesión
18	5	Pérdida de peso <20%, sin atrofia muscular	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
19	0	Sin pérdida de peso, con atrofia muscular	Células inflamatorias aisladas o pequeños focos de inflamación	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
20	2	Pérdida de peso <20%, sin atrofia muscular	Presencia de dos o más focos inflamatorios de pequeño a moderado tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
25	4	Pérdida de peso <20%, con atrofia muscular	Sin lesión	Sin lesión
26	5	Sin pérdida de peso,	Presencia de uno o más focos	Infiltrado granulomatoso con presencia

		con atrofia muscular	inflamatorios de gran tamaño	esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
27	2	Sin pérdida de peso ni atrofia muscular	Sin lesión	Sin lesión
28	6	Pérdida de peso <20%, sin atrofia muscular	Células inflamatorias aisladas o pequeños focos de inflamación	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
33	5	Pérdida de peso <20%, con atrofia muscular	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
35	2	Sin pérdida de peso, con atrofia muscular	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
41	1	Sin pérdida de peso, con atrofia muscular	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
50	6	Pérdida de peso <20%, con atrofia muscular	Presencia de dos o más focos inflamatorios de pequeño a moderado tamaño	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
51	10	Pérdida de peso >20%, con atrofia muscular	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
54	7	Pérdida de peso >20%, sin atrofia muscular	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
56	4	Pérdida de peso <20%, sin atrofia muscular	Presencia de dos o más focos inflamatorios de pequeño a moderado tamaño	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos

Tabla 6-Anexos . Resultados obtenidos (% = % de área teñida) obtenidos por Image J para linfocitos, inmunoglobulinas y macrófagos en tejido muscular

ID	% Linfocitos			% Inmunoglobulinas			% Macrófagos
	CD3	CD8	PAX5	IgG	IgM	IgA	
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0,90	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	27,85	0,303	0,121	0,067	5,102	0	2,899
6	5,26	0,079	0	0,848	0	0	0
7	0,43	0,198	0,136	0	0	0	0
8	0,55	0,021	0,047	0,687	0	0	0,372
9	7,44	0,290	0,896	2,268	0,180	0	3,196
10	0,97	0,066	0,097	0,378	0	0	0,230
11	0,32	0,090	0	0	0	0	0,172
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	1,08	0,013	0,006	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0
18	7,09	0,339	0	0,022	0,280	0	0
19	1,44	0	0	0	0	0	0
20	3,48	0,184	1,339	0	0	0	0,339
21	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0
26	6,28	0,421	1,754	0,297	0,283	0	0,478
27	0	0	0	0	0	0	0
28	0,93	0,057	0,121	0,856	0	0	0
33	0,67	0,344	0,406	0,403	0,076	0	0,45
35	0,35	0,1	0	0	0	0	0,03
41	0,25	0,332	0	0,407	0,121	0	1,380
50	0,08	0,071	0,303	0,437	0,196	0	0,254
51	5,07	0,084	0,258	0,591	0,551	0	0,103
54	4,42	0,122	0,594	0,131	0,313	0	0,792
56	3,07	0,221	0,161	0	0	0	0,125

Tabla 7-Anexos. Resultados obtenidos de la detección de amastigotes en tejido muscular por IHQ y de DNA de *L.infantum* por qPCR y la intensidad de lesión mediante HE. POS: Positivo, NEG: Negativo.

ID	IHQ	qPCR		HE
	Resultado	Células/mg tej	Resultado	Intensidad de lesión
1	NEG	0	NEG	Ausente
2	NEG	1,56E+04	POS	Ligera/Moderada
3	NEG	0	NEG	Ausente
5	POS	0	NEG	Intensa
6	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
7	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
8	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
9	POS	1,32E+04	POS	Intensa
10	POS	1,17E+05	POS	Intensa
11	NEG	3,85E+00	POS	Ligera/Moderada
13	NEG	0	NEG	Ausente
14	NEG	0	NEG	Ausente
15	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
17	NEG	0	NEG	Ausente
18	NEG	0	NEG	Intensa
19	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
20	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
25	NEG	0	NEG	Ausente
26	NEG	0	NEG	Intensa
27	NEG	0	NEG	Ausente
28	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
33	POS	0	NEG	Intensa
35	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
41	NEG	0	NEG	Intensa
50	NEG	4,86E+03	POS	Ligera/Moderada
51	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
54	POS	0	NEG	Intensa
56	NEG	0	NEG	Intensa

Tabla 8-Anexos. Resultados puntuación clínica total (PC), histopatología (HE) de cada animal detallando el tipo y la intensidad de las lesiones en testículo

ID	PC	HE	
		Intensidad de la lesión	Tipos de lesión
3	1	Sin lesión	Sin lesión
5	8	Presencia de dos o más focos inflamatorios de pequeño a moderado tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
8	6	Células inflamatorias aisladas o pequeños focos de inflamación	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
9	11	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
10	10	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
11	7	Células inflamatorias aisladas o pequeños focos de inflamación	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
14	1	Sin lesión	Sin lesión
15	4	Sin lesión	Sin lesión
18	5	Sin lesión	Sin lesión
19	0	Sin lesión	Sin lesión
20	2	Sin lesión	Sin lesión
26	5	Sin lesión	Sin lesión
27	2	Sin lesión	Sin lesión
28	6	Células inflamatorias aisladas o pequeños focos de inflamación	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
33	5	Presencia de dos o más focos inflamatorios de pequeño a moderado tamaño	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
35	2	Células inflamatorias aisladas o pequeños focos de inflamación	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
51	10	Células inflamatorias aisladas o pequeños focos de inflamación	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
56	4	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos

Tabla 9-Anexos. Resultados obtenidos (% = % de área teñida) obtenidos por Image J para linfocitos, inmunoglobulinas y macrófagos en testículo.

ID	% Linfocitos			% Inmunoglobulinas			%Macrófagos
	CD3	CD8	PAX5	IgG	IgM	IgA	
3	0	0	0	0	0	0	0,026
5	1,258	0,074	1,075	0	0	0	0,025
8	1,966	0,01	0,156	0	0,151	0	0,423
9	4,594	0,463	0,459	0,201	0,457	0	0,448
10	5,535	0,569	0	0,331	0,086	0	0,115
11	0,3	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0,068
19	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0
33	1,315	0,091	0	0,61	0,057	0	0,021
35	0,732	0	0	0	0	0	0
51	0,997	0	0	0	0	0	0,041
56	2,259	0,185	0,05	0,407	1,306	0	0,062

Tabla 10-Anexos. Resultados de IHQ y de DNA de *L.infantum* por qPCR y la intensidad de lesión. POS: Positivo, NEG: Negativo.

ID	IHQ	qPCR		HE
	Resultado	Células/mg tej	Resultado	Intensidad de lesión
3	NEG	0	NEG	Ausente
5	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
8	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
9	NEG	0	NEG	Intensa
10	NEG	1,07E+05	POS	Intensa
11	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
14	NEG	0	NEG	Ausente
15	NEG	0	NEG	Ausente
18	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
19	NEG	0	NEG	Ausente
20	NEG	0	NEG	Ausente
26	NEG	0	NEG	Ausente
27	NEG	0	NEG	Ausente
28	NEG	0	NEG	Ausente

33	NEG	0	NEG	Intensa
35	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
51	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
56	NEG	0	NEG	Intensa

Tabla 11-Anexos. Resultados puntuación clínica total (PC), histopatología (HE) de cada animal detallando la intensidad y las características de las lesiones de los animales infectados.

ID	PC	HE	
		Intensidad de la lesión	Tipo de lesión
3	1	Presencia de dos o más focos inflamatorios de pequeño a moderado tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
5	8	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado piogranulomatoso, predominio de macrófagos, acompañados de un número mayor de neutrófilos.
8	6	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado piogranulomatoso, predominio de macrófagos, acompañados de un número mayor de neutrófilos.
10	10	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
11	7	Presencia de dos o más focos inflamatorios de pequeño a moderado tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
14	1	Sin lesión	Sin lesión
15	4	Células inflamatorias aisladas o pequeños focos de inflamación	Células inflamatorias aisladas o pequeños focos de inflamación
18	5	Presencia de dos o más focos inflamatorios de pequeño a moderado tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
19	0	Células inflamatorias aisladas o pequeños focos de inflamación	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
20	2	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
26	5	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado piogranulomatoso, predominio de macrófagos, acompañados de un número mayor de neutrófilos.
27	2	Células inflamatorias aisladas o pequeños focos de inflamación	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
28	6	Presencia de dos o más focos inflamatorios de pequeño a moderado tamaño	Infiltrado piogranulomatoso, predominio de macrófagos, acompañados de un número mayor de neutrófilos.
33	5	Presencia de dos o más focos inflamatorios de pequeño a moderado tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
35	2	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado granulomatoso con presencia esporádica de linfocitos, células plasmáticas y/o neutrófilos
51	10	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado linfoplasmocitario, y en menor grado neutrófilos y/o macrófagos
56	4	Presencia de uno o más focos inflamatorios de gran tamaño	Infiltrado piogranulomatoso, predominio de macrófagos, acompañados de un número mayor de neutrófilos.

Tabla 12-Anexos. Resultados obtenidos (% = % de área) obtenidos por Image J para linfocitos, inmunoglobulinas y macrófagos en epidídimo.

ID	% Linfocitos			% Inmunoglobulinas			%Macrófagos
	CD3	CD8	PAX5	IgG	IgM	IgA	
3	1,44	0,133	0,78	0	1,697	0	2,859
5	5,163	1	0,05	0,176	0,076	0	7,221
8	2,727	0,22	0,149	0,375	0	0	6,287
10	5,847	0,713	2,481	0,639	6,657	0	1,472
11	1,201	0,045	2,309	0,582	0,378	0	0,5
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0,562	0,455	3,29	0,043	2,753	0	0
18	3,135	0,215	0,737	0,188	0,172	0	0,059
19	0,747	0	1,351	0,466	0,153	0	0
20	18,468	0,193	7,255	0,593	0,551	0	4,208
23	0	0	0	0	0	0	0
26	0,285	0,299	0,056	0	0,115	0	1,183
27	0,137	0	0	0	0	0	0,228
28	2,139	0,206	0,238	0,282	0	0	2,725
33	0,654	0,263	0,445	0,552	0,4	0	3,708
35	3,885	0,325	5,446	1,591	0,916	0	2,075
51	5,681	0,334	0,911	0,32	1,804	0	0,686
56	6,762	0,284	6,106	1,471	6,171	0	2,315

Tabla 13-Anexos. Resultados obtenidos de la detección de amastigotes en epidídimo por IHQ y de DNA de *L.infantum* por qPCR y la intensidad de lesión mediante HE. POS: Positivo, NEG: Negativo.

	IHQ	qPCR		HE
ID	Resultado	Células/mg tej	Resultado	Intensidad de lesión
3	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
5	NEG	0	NEG	Intensa
8	POS	1,06E+05	POS	Intensa
10	POS	1,33E+05	POS	Intensa
11	POS	1,05E+05	POS	Ligera/Moderada
14	NEG	1,33E+05	POS	Ausente
15	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
18	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
19	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
20	NEG	0	NEG	Intensa
26	NEG	9,64E+04	POS	Intensa
27	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
28	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada

33	NEG	0	NEG	Ligera/Moderada
35	NEG	0	NEG	Intensa
51	NEG	1,05E+05	POS	Intensa
56	NEG	0	NEG	Intensa

Tabla 14-Anexos. Datos de Proteína urinaria (uProt). Creatinina urinaria (uCrea). UPC (uProt/uCrea) y Creatinina sérica (sCr) para la asignación de grupos según IRIS.

ID	uProt mg/dL	uCrea mg/dL	UPC	Interpretación UPC	sCr mg/dL	Azotémico	Grupo IRIS
1	221	171,4	1,29	Proteinúrico	0,66	No	3
2	45	166	0,27	Border line	0,62	No	2
3	207	220,41	0,94	Proteinúrico	0,76	No	3
6	48	248,91	0,19	No proteinúrico	0,78	No	1
8	189	75,36	2,51	Proteinúrico	0,65	No	3
11	84	208,98	0,40	Border line	0,42	No	2
12	45	191,48	0,24	Border line	0,58	No	2
13	27	230,64	0,12	No proteinúrico	0,66	No	1
14	127	163,33	0,78	Proteinúrico	0,76	No	3
15	223	137,49	1,62	Proteinúrico	0,98	No	3
17	45	153,25	0,29	Border line	0,72	No	2
18	114	79,28	1,44	Proteinúrico	0,97	No	3
19	26	173,4	0,15	No proteinúrico	0,94	No	1
20	44	95,31	0,46	Border line	0,89	No	2
21	45	186,03	0,24	Border line	0,6	No	2
22	34	175,92	0,19	No proteinúrico	0,75	No	1
23	34	194,85	0,17	No proteinúrico	1,12	No	1
24	252	85,03	2,96	Proteinúrico	0,67	No	3
25	36	163,32	0,22	Border line	0,66	No	2
26	157	159,42	0,98	Proteinúrico	0,57	No	3
27	264	188,88	1,40	Proteinúrico	0,75	No	3
28	123	103,99	1,18	Proteinúrico	0,81	No	3
33	249	102,52	2,43	Proteinúrico	0,56	No	3
34	8	36,96	0,22	Border line	0,64	No	2
35	231	81,79	2,82	Proteinúrico	0,36	No	3
41	106	159,56	0,66	Proteinúrico	0,84	No	3
42	7	27,93	0,25	Border line	0,53	No	2
45	35	33,79	1,04	Proteinúrico	0,34	No	3
48	104	55,57	1,87	Proteinúrico	0,94	No	3
50	38	62,97	0,60	Proteinúrico	0,56	No	3
54	8	10,28	0,78	Proteinúrico	0,58	No	3
56	78	58,43	1,33	Proteinúrico	0,98	No	3

Tabla 15-Anexos . Valores de NGAL obtenidos a partir de la ecuación de la recta de calibrado y cálculo del ratio NGAL urinario/ Creatinina urinaria (UNC)

ID	uNGAL mg/dl	uCr mg/dL	UNC	ID	uNGAL mg/dl	uCr mg/dL	UNC
1	42,66	171,4	0,249	23	0,5	194,85	0,003
2	28,3	166	0,170	24	0,5	85,03	0,006
3	48,99	220,41	0,222	25	1,12	163,32	0,007
6	4,53	248,91	0,018	26	49,53	159,42	0,311
8	73,59	75,36	0,977	27	43,42	188,88	0,230
11	73,78	208,98	0,353	28	71,71	103,99	0,690
12	0,91	191,48	0,005	33	55,33	102,52	0,540
13	0,5	230,64	0,002	34	23,51	36,96	0,636
14	58,18	163,33	0,356	35	20,52	81,79	0,251
15	58,3	137,49	0,424	41	55,34	159,56	0,347
17	22,71	153,25	0,148	42	40,84	27,93	1,462
18	24,49	79,28	0,309	45	46,43	33,79	1,374
19	0,5	173,4	0,003	48	44,38	55,57	0,799
20	53,11	95,31	0,557	50	66,02	62,97	1,048
21	9,41	186,03	0,051	54	31,28	10,28	3,043
22	0,27	175,92	0,002	56	65,63	58,43	1,123

Tabla 16-Anexos Clasificación y características de los resultados histológicos. Asignación de grupo por % glomérulos afectados, nefritis intersticial (N.I.) y tipo de glomerulonefritis (GN)

ID	GRUPO	Nefritis intersticial	Tipo glomerulonefritis
1	2	No	Mesangioproliferativa
2	2	No	Mesangioproliferativa
3	2	Sí	Mesangioproliferativa
6	2	No	Mesangioproliferativa
8	2	Sí	Mesangioproliferativa
11	2	Sí	Mesangioproliferativa
12	2	No	Mesangioproliferativa
13	1	No	Sin lesión
15	2	No	Membranoproliferativa
17	3	Sí	Membranoproliferativa
18	3	No	Mesangioproliferativa
19	1	No	Sin lesión
20	3	No	Mesangioproliferativa
21	1	No	Sin lesión
22	1	No	Sin lesión
23	1	No	Sin lesión
24	3	No	Mesangioproliferativa
25	2	Sí	Membranoproliferativa
26	3	Sí	Membranoproliferativa
27	2	No	Membranoproliferativa
28	3	Sí	Membranoproliferativa

33	3	No	Membranoproliferativa
34	2	Sí	Membranoproliferativa
35	2	Sí	Membranoproliferativa
41	3	Sí	Membranoproliferativa
42	3	Sí	Mesangioproliferativa
45	3	Sí	Mesangioproliferativa
50	3	Sí	Membranoproliferativa
54	2	Sí	Mesangioproliferativa
56	2	Sí	Mesangioproliferativa

10. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Leishmania</i> (Levine 1980)	8
Tabla 2. Clasificación taxonómica de los flebotomos vectores de <i>L. infantum</i> (Killick-Kendrick, 1999).	12
Tabla 3. Descripción de los signos clínicos establecidos en la exploración clínica para calcular la puntuación clínica de cada paciente.....	47
Tabla 4. Detalles de los marcadores de células inflamatorias.	57
Tabla 5. Puntuación clínica (PC) total de cada animal.....	67
Tabla 6. Tabla de contingencia con la frecuencia de los resultados positivos y negativos de las pruebas de qPCR en nódulo linfático y médula de los animales infectados.....	69
Tabla 7. Mediana, mínimo y máximos de la clínica, serología y carga parasitaria expresado por los animales según el sexo.....	69
Tabla 8. Tabla de contingencia con la frecuencia de los resultados positivos y negativos de las pruebas de IFI y ELISA.	70
Tabla 9. Tablas de contingencia con la frecuencia de los resultados positivos y negativos obtenidos mediante las pruebas serológicas de IFI y ELISA y los resultados de qPCR tanto en nódulo linfático como en médula. Resultados e interpretación del Coeficiente Kappa de Cohen.	71
Tabla 10. Coeficiente de correlación Rho de Spearman entre los resultados de IFI y ELISA y los resultados de qPCR en linfonodo y en médula.	71
Tabla 11 Distribución de los animales en función de la clínica como referencia de enfermedad.	72
Tabla 12. Distribución de los animales en función de la clínica y la qPCR.....	74
Tabla 13. Frecuencia de aparición de animales según las características de la lesión (tipo e intensidad)	76
Tabla 14. Medianas (mínimos – máximos) de la clínica de los animales según la intensidad de lesión expresada en músculo facial temporal.....	77
Tabla 15. Frecuencia de los animales según de presencia y ausencia de atrofia muscular y lesión.	77
Tabla 16. Frecuencia de los animales según la presencia y ausencia de pérdida de peso y lesión.	77
Tabla 17. Mediana (mínimo – máximo) del %RIPC de ELISA de los animales según la intensidad de lesión expresada en músculo facial temporal.....	78
Tabla 18. Tabla de contingencia con la frecuencia de aparición de animales según el estado serológico clasificado como positivo y positivo alto, y características de lesión (linfoplasmocitaria o granulomatosa)	79
Tabla 19. Medianas (mínimos – máximos) del %RIPC de ELISA de los animales según el tipo de lesión expresada en músculo temporal.	79

Tabla 20. Correlación de Spearman entre los tipos celulares.....	83
Tabla 21. Mediana (mínimo – máximo) del % de área expresado por cada tipo celular según la intensidad de lesión expresada en músculo temporal.	84
Tabla 22. Correlación de Spearman entre intensidad de lesión y tipos celulares.	84
Tabla 23. Mediana (mínimo – máximo) del % de área expresado por cada tipo celular según el tipo de lesión expresada en músculo temporal.	85
Tabla 24. Frecuencia de animales positivos y negativos a la detección de amastigotes por IHQ respecto a la intensidad de lesión.....	85
Tabla 25. Frecuencia de animales positivos y negativos a la detección de parásito por qPCR respecto a la intensidad de lesión.....	86
Tabla 26. Tabla de contingencia de la frecuencias de los resultados de qPCR y de IHQ para la detección de amastigotes de <i>Leishmania infantum</i>	87
Tabla 27. Mediana (mínimo – máximo) del % de área expresado por cada tipo celular según la intensidad de lesión expresada en tejido muscular.....	87
Tabla 28. Tabla de contingencia con la frecuencia de animales según el tipo de lesión y la intensidad de la misma en testículo.....	89
Tabla 29. Medianas (mínimos – máximos) de la clínica de los animales según la intensidad de lesión expresada en el testículo.	89
Tabla 30. Mediana (mínimo – máximo) del %RIPC de ELISA de los animales según el tipo de lesión expresada en testículo.....	90
Tabla 31. Correlación de Spearman entre los tipos celulares en testículo.....	93
Tabla 32. Medianas (mínimos – máximos) del % de área expresado por cada tipo celular según la intensidad de lesión expresada en testículo.	94
Tabla 33. Correlaciones de Spearman entre intensidad de lesión y tipos celulares en testículo...	94
Tabla 34. Medianas (mínimos – máximos) del % de área expresado por cada tipo celular según las características de lesión expresada testículo.....	95
Tabla 35. Frecuencia de animales positivos y negativos a la detección de amastigotes por qPCR respecto a la intensidad de lesión.....	95
Tabla 36. Tabla de contingencia de la frecuencias de los resultados de qPCR y de IHQ para la detección de amastigotes de <i>Leishmania infantum</i>	96
Tabla 37. Medianas (mínimos – máximos) del % de área expresado por cada tipo celular según la intensidad de lesión expresada en testículo.	96
Tabla 38. Tabla de contingencia con la frecuencia de animales según el tipo de lesión y la intensidad de la misma en epidídimo.	98

Tabla 39. Mediana (mínimo – máximo) del %RIPC de ELISA de los animales según el tipo de lesión expresada en epidídimo.	98
Tabla 40. Correlación de Spearman entre los tipos celulares en epidídimo.	102
Tabla 41. Mediana (mínimo – máximo) del % de área expresado por cada tipo celular según la intensidad de lesión expresada en epidídimo.....	102
Tabla 42. Correlaciones de Spearman entre intensidad de lesión y tipos celulares en epidídimo	103
Tabla 43. Mediana (mínimos – máximos) del % de área expresado por cada tipo celular según el tipo de lesión expresado en epidídimo.....	103
Tabla 44. Tabla de contingencia de las frecuencias de los resultados de qPCR y de IHQ para la detección de amastigotes de <i>Leishmania infantum</i> en epidídimo.	104
Tabla 45. Mediana (mínimo – máximo) del % de área expresado por cada tipo celular según la presencia y ausencia de parásito detectado mediante qPCR en epidídimo.....	105
Tabla 46. Mediana (mínimo – máximo) del % de área expresado por cada tipo celular según la presencia y ausencia de parásito detectado mediante IHQ en epidídimo.	105
Tabla 47 . Medianas (mínimos y máximos) de UPC y UNC en función de los grupos IRIS.....	107
Tabla 48. Número y frecuencia de animales en función del grado de lesión subdivididos en animales con o sin nefritis intersticial.....	110
Tabla 49. Medianas (mínimos y máximos) de UPC y UNC en función de los grupos de grado de lesión glomerular (histología)	111
Tabla 50. Medianas (mínimos y máximos) de UPC y UNC en función de los grupos de grado de lesión glomerular en los animales con lesión membranoproliferativa.....	112
Tabla 51. Medianas (mínimos y máximos) de UPC y UNC en función de los grupos de grado de lesión glomerular en el los animales con lesión mesangioproliferativa.	113
Tabla 52. Tabla de contingencia entre grado de glomerulonefritis e intensidad de lesión en epidídimo.	114
Tabla 53 Tabla de contingencia con las frecuencias relativas de los animales en función de la lesión muscular y glomerular.	114
Tabla 54. Tabla de contingencia con las frecuencias relativas de los animales en función de la lesión testicular y glomerular.....	115
Tabla 55. Medianas (mínimos y máximos) de NGAL (mg/dL) en función de los grupos intensidad de lesión muscular	115
Tabla 56. Medianas (mínimos y máximos) de NGAL (mg/dL) en función de los grupos de intensidad de lesión testicular	116

Tabla 57. Medianas (mínimos y máximos) de NGAL (mg/dL) en función de los grupos de intensidad de lesión en epidídimo	116
---	-----

11. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación del género <i>Leishmania</i> , basada en caracteres intrínsecos (isoenzimas) y taxonomía numérica (WHO, 2010). *Especies sometidas a reclasificación. <i>L. chagasi</i> en el Nuevo Mundo es sinónimo de <i>L. infantum</i> en el Viejo Mundo.....	9
Figura 2. Amastigotes de <i>L. infantum</i> en el interior de un macrófago	11
Figura 3. Promastigotes en medio de cultivo	11
Figura 4. A: Hembra de <i>P. perniciosus</i> alimentada,	14
Figura 5. Ciclo biológico de <i>L. infantum</i>	16
Figura 6. Países con alta carga en leishmaniosis cutánea y visceral. Punteado: países que han reportado más de 2500 casos de leishmaniosis cutánea. Fondo gris: países que reportaron más de 100 casos de leishmaniosis visceral. WHO 2016.....	19
Figura 7. Respuesta inmunitaria regulada por linfocitos T. (Modificado de Baneth 2008)	28
Figura 8 Foto de tubos de vidrio con medio NNN para el cultivo in vitro de promastigotes.	46
Figura 9. Reacción de inmunofluorescencia indirecta frente a <i>L. infantum</i> positiva (A) y negativa (B).	50
Figura 10 Curva estándar de amplificación de DNA correspondiente a 2×10^7 - 2×10^2 promastigotes de <i>Leishmania infantum</i>	53
Figura 11 Recta de calibrado y ecuación de la recta para el cálculo de la concentración de NGAL61	
Figura 12. Representación para el cálculo de sensibilidad y especificidad de ELISA e IFI teniendo en cuenta tanto la clínica como la qPCR. Color rojo: Positivo a qPCR por nódulo linfático y/o médula. Color azul: Negativo a qPCR en nódulo linfático y médula. Triángulo: Hembra. Círculo: Macho	73
Figura 13. Inflamación en tejido muscular (HE). A: Foco de inflamación de carácter intenso 50x. B: Detalle del foco de inflamación intenso de tipo granulomatoso 200x. C: Foco de inflamación de carácter ligero.	75
Figura 14. Puntuación clínica en función de la intensidad de lesión. La gráfica muestra la mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), mínimo y máximo (barras). *P<0,05	78
Figura 15. Imágenes de Linfocitos T CD3 detectados por Inmunohistoquímica en músculo temporal. A y B : presencia de CD3 en lesiones de carácter Ligero/Moderado. 200x. C: presencia de CD3 en lesión de carácter Intenso. 400x.....	80
Figura 16. Imágenes de Linfocitos T CD8 detectados por Inmunohistoquímica en músculo temporal. A y B : presencia de CD8 en lesiones de carácter Intenso. 400x	80
Figura 17. Imágenes de Linfocitos B detectados por Inmunohistoquímica en músculo temporal. A : presencia de linfocitos B en lesiones de carácter Intenso. 400x. B : presencia de linfocitos B en lesiones de carácter Moderado. 400x.....	81

Figura 18. Imágenes de las inmunoglobulinas detectados por Inmunohistoquímica en músculo temporal. A y B : presencia de IgG en lesiones de carácter Intenso. 400x. C y D : presencia de IgM en lesiones de carácter Intenso. 400x.....	82
Figura 19. Imágenes de macrófagos detectados por Inmunohistoquímica en músculo temporal. A : presencia de macrófagos en lesiones de carácter intenso. 400x. B : presencia de macrófagos en lesiones de carácter moderado. 400x.	82
Figura 20 Imágenes de amastigotes detectados por Inmunohistoquímica. A : presencia de amastigotes en lesión de carácter Intenso. 40x. B: presencia de amastigote en lesiones de carácter Intenso. 60x. Las flechas señalan los amastigotes.	86
Figura 21. Inflamación y atrofia en testículo (HE). A: Inflamación multifocal de carácter moderado. 100x. B: Foco inflamatorio moderado de tipo granulomatoso 200x	88
Figura 22. Imágenes de LinfocitosT CD3 detectados por Inmunohistoquímica en testículo. A : presencia de linfocitos T en lesión de carácter ligero. 200x. B : presencia de linfocitos T en lesiones de carácter intenso. 200x.....	91
Figura 23. Imagen de LinfocitosT CD8 detectados por Inmunohistoquímica en testículo en infiltrado de carácter intenso. 200x.	91
Figura 24. Imagen de Linfocitos B detectados por Inmunohistoquímica en testículo en infiltrado de carácter intenso. 200x.	91
Figura 25. Imágenes de las inmunoglobulinas detectados por Inmunohistoquímica en testículo. A : presencia de IgG en lesión de carácter intenso. 200x. B: presencia de IgM en lesión de carácter intenso. 200x.	92
Figura 26. Imágenes de macrófagos detectados por Inmunohistoquímica en testículo. A: presencia de macrófagos en lesiones de carácter Intenso. 200x. B: presencia de macrófagos en zona sin lesión.200x.	92
Figura 27. Epididimitis (HE). A: Inflamación de carácter intenso 50x. B Detalle de inflamación de tipo linfoplasmocitaria y granulomatosa 100x.....	97
Figura 28 Imágenes de Linfocitos T CD3 detectados por Inmunohistoquímica en epidídimo. A: presencia de CD3 en lesión de carácter intenso. 200x. B: presencia de CD3 en lesión de carácter moderado. 200x.	99
Figura 29. Imagen de Linfocitos T CD8 detectados por Inmunohistoquímica en epidídimo en infiltrado inflamatorio intenso.200x.	99
Figura 30. Imágenes de Linfocitos B detectados por Inmunohistoquímica en epidídimo. A: presencia de linfocitos B en lesión de carácter intenso. 200x. B: presencia de linfocitos B en lesión de carácter ligero. 200x.....	100

Figura 31. Imágenes de las células plasmáticas detectados por Inmunohistoquimic en epidídimo. A : presencia de IgG en lesión de carácter Intenso. 200x. B: presencia de IgM en lesión de carácter Intenso. 200x.....	100
Figura 32. Imágenes de macrófagos detectados por Inmunohistoquimica en epidídimo. A: presencia de macrófagos en lesión de carácter Intenso. 200x. B: presencia de macrófagos lesión de carácter moderado.200x.	101
Figura 33. Imagen de amastigotes detectados por Inmunohistoquimica en epidídimo en lesión de carácter Intenso. Las flechas señalan los amastigotes. 400x.....	104
Figura 34. Creatinina sérica (sCr mg/dL) de cada animal (Identificación). La caja roja corresponde al intervalo de referencia Valor de referencia 0,5-1,4	106
Figura 35. UPC y UNG en los diferentes grupos de IRIS. La gráfica muestra la mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran la significación siendo: *P<0,05 **P<0.01	108
Figura 36. Imagen de glomerulonefritis de tipo membranoproliferativa (HE) A: glomerulonefritis membranoproliferativa difusa,400x. B: glomerulonefritis membranoporliferativa segmental, 400x.....	109
Figura 37. Glomerulonefritis de tipo mesangioproliferativa(HE) A: glomerulonefritis mesangioproliferativa con adherencias en la cápsula de Bowman,400x. B: glomerulonefritis mesangioproliferativa con degeneración tubular,400x.....	109
Figura 38. UPC y UNG en los diferentes grupos intensidad de glomerulonefritis. La gráfica muestra la mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p siendo: **P < 0,01 ***P < ,.001	111
Figura 39. UPC y UNG en los diferentes grupos de intensidad de glomerulonefritis de tipo membranoproliferativa (GNMBP). La gráfica muestra la mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de P siendo: *P < 0,05 *P < 0,01	112
Figura 40. UPC y UNG en los diferentes grupos de intensidad de glomerulonefritis de tipo mesangioproliferativa (GNMSP). La gráfica muestra la mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de P siendo: *P < 0,05 **P < 0,01	113

12. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

% RIPC: Relative index per cent /porcentaje de índice relativo

‰: Porcentaje

>: Mayor que

<: Menor que

°C: Grado (s) Celsius

CD3: Cluster de diferenciación 3. Linfocitos T

CD4: Cluster de diferenciación 4. Linfocitos T CD4

CD8: Cluster de diferenciación 8. Linfocitos T citotóxicos

DAT: Técnica de aglutinación directa

dL: Decilitro

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPX: Dibutylphthalate Poliestireno Xileno

ELISA: Enzimo inmunoensayo

FN: Falsos positivos

FP: Falsos negativos

GNMBL:Glomerulofegritis membranoproliferativa

GNMSP:Glomerulonefritis mesangioproliferativa

HE: Hematoxilina-Eosina

IC: Inmunocomplejos

ID: Identificación

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IFN-γ: Interferón gamma

Ig: Inmunoglobulina

IL-10: Interleuquina 10

IL-12: Interleuquina 12

IL-2: Interleuquina 2

IL-4: Interleuquina 4

iNOS: Óxido nítrico sintasa

IRC. Insuficiencia renal crónica

IRIS: Sociedad Internacional de Interés Renal

Lcan: Leishmaniosis canina

Log: Logaritmo

LPL: Técnica de linfoproliferación

LST. Test de Montenegro de Leishmania

LV: Leishmaniosis visceral

mg: Miligramos

min: Minutos

mL: Millilitro

NGAL: Proteína lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos

NNN: Medio Novi, McNeal, Nicolle

NTDs: Enfermedades tropicales olvidadas o desatendidas

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Tampón Fosfato Salino

PC: Puntuación clínica

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa
cuantitativa

RNA: Ácido ribonucleico

RPMI 1640: Medio de cultivo Rosswell Park
Memorial Institute

s: Segundos

Th: Linfocito T colaborador

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral

Treg: Linfocito T regulador

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VN: Verdaderos negativos

VP: Verdaderos positivos

WHO: Organización Mundial de la Salud

xg: Unidades de la fuerza de centrifugación
relativa (RCF)

μm : Micrómetros